

Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie
der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)
und aus dem
Bundesamt für Veterinärwesen Bern
(Direktor: Prof. Dr. H. Keller)

**Die Analyse von Azaperon (Stresnil®)
in Schweinenieren:
Eine methodische Untersuchung**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
PETER FLÜCKIGER
Tierarzt
von Huttwil und Rüschlikon

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. E. Jenny, Referent
Prof. Dr. H. Keller, Korreferent

1981



Aus dem Institut für Pharmakologie und Biochemie
der Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. med. E. Jenny)

und aus dem

Bundesamt für Veterinärwesen Bern

(Direktor: Prof. Dr. H. Keller)

**Die Analyse von Azaperon (Stresnil®)
in Schweinenieren:
Eine methodische Untersuchung**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Veterinär-Medizinischen Fakultät

der Universität Zürich

vorgelegt von

PETER FLÜCKIGER

Tierarzt

von Huttwil und Rüschlikon

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. E. Jenny, Referent

Prof. Dr. H. Keller, Korreferent

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

- 1.1. Fleischschaurechtliche Vorschriften über Rückstände
- 1.2. Rückstandsproblem
- 1.3. Uebersicht über die Psychopharmaka
- 1.4. Einsatz von Beruhigungsmitteln beim Schlachtschwein
- 1.5. Stresnil^R (Azaperon)
 - 1.5.1. Pharmakologie und Toxikologie
 - 1.5.2. Pharmakokinetik
 - 1.5.3. Spezielle Untersuchungen über Rückstände im Fleisch
 - 1.5.4. Einfluss des Azaperons auf die Fleischbeschaffenheit

2. PROBLEMSTELLUNG

3. MATERIAL UND METHODEN

- 3.1. Tiermaterial
- 3.2. Bezugssubstanzen
- 3.3. Extraktionsmethode
- 3.4. Dünnschichtchromatographie
- 3.5. Gaschromatographie
 - 3.5.1. Gaschromatographie mit gepackter Säule
 - 3.5.2. Gaschromatographie mit Kapillare
- 3.6. High Performance Liquid Chromatography
- 3.7. Radioimmunoassay
- 3.8. Bestimmung der Ausbeuten aus Nieren
- 3.9. Bestimmung der zeitlichen Nachweisgrenzen

4. RESULTATE UND DISKUSSION

- 4.1. Vergleich der Empfindlichkeiten und Kritik der Methoden
 - 4.1.1. Dünnschichtchromatographie
 - 4.1.2. Gaschromatographie
 - 4.1.3. High Performance Liquid Chromatography
 - 4.1.4. Radioimmunoassay

- 4.2. Bestimmung der Ausbeuten aus Nierenhomogenat
- 4.3. Bestimmung der zeitlichen Nachweisgrenzen
- 4.4. Vorschlag zur Ueberwachung des Fleisches auf Rückstände
- 4.5. Das Rückstandsproblem aus meiner Sicht

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

7. DANKESADRESSEN

8. LEBENS LAUF

9. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

9.1. Tabellen

9.2. Abbildungen

Abkürzungen

HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography (Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie)
GC	Gaschromatographie
GC / Kap.	Gaschromatographie mit Kapillarsäule
GC / GGS	Gaschromatographie mit gepackter Glassäule
DC	Dünnschichtchromatographie
DFD	Dark-Firm-Dry
PSE	Pale-Soft-Exudative
RIA	Radioimmunoassay
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
KF-Wert	Korrekturfaktor, berechnet nach der Formel: (relative Responsegrösse, bezogen auf die Gewichtseinheit)
KF	$= \frac{\text{Fläche Standard} \times \text{Gewicht Probe}}{\text{Fläche Probe} \times \text{Gewicht Standard}}$
Stresnil ^R	Handelslösung, enthält 40 mg/ml Azaperon
Azaperon	Trivialname für 1-(4-Fluorophenyl)-4-[4-(2-pyridinyl)-1-piperazinyl]-1-butanon
Azaperol	Hauptmetabolit des Azaperons
Area	Durch den Integrator berechnete, flächenäquivalente Grösse unter der Kurve mit der Einheit $\mu\text{V}/\text{sec}$
Peakfläche	Fläche unter der Kurve, ausgedrückt in mm^2 . Die Berechnung kann mit der Annäherungsformel: $F = \text{Peakhöhe} \times \text{Halbwertsbreite}$, erfolgen.
Si-60 Säule	Silicagel-60 Säule
RP-2 Säule	HPLC Säule für die Reversed-Phase-Chromatography, bestehend aus einer C_2 - Verbindung
RP-8 Säule	wie RP-2 Säule, aber gefüllt mit einer C_8 - Verbindung
RP-18 Säule	wie RP-2 Säule, aber gefüllt mit einer C_{18} - Verbindung
OV-17	Methyl-Phenyl-Silikon
V/V	Volumen zu Volumen
HPTLC	High-Performance-Thin-Layer-Chromatography
UV	Ultraviolett
FID	Flammenionisationsdetektor
Alkali-FID	Alkaliflammendetektor
ng	Nanogramm = 10^{-9} g
μg	Mikrogramm = 10^{-6} g
$\mu\text{g/g}$	Mikrogramm pro Gramm = ppm
ng/g	Nanogramm pro Gramm = ppb

1. EINLEITUNG

1.1. Fleischschaurechtliche Vorschriften über Rückstände

Nach Artikel 35 Absatz 2 der Eidgenössischen Fleischschauverordnung vom 11. Oktober 1957 (EFV) dürfen den Schlachttieren keine Stoffe oder Präparate verabreicht werden, welche die Beschaffenheit oder die Haltbarkeit des Fleisches in unzulässiger Weise beeinflussen können. Insbesondere werden darin Stoffe mit östrogen- oder thyreostatischer Wirkung zur Veränderung des Fleisch- oder Fettansatzes oder zur sexuellen Neutralisation während der Mast erwähnt.

Fleisch oder Fleischwaren, die in den Verkehr gebracht werden, dürfen nach Artikel 60, Absatz 1 EFV nicht verfälscht, verdorben, verunreinigt oder gesundheitsschädlich sein oder unzulässige Stoffe enthalten. Unzulässig sind alle nicht ausdrücklich in der Verordnung erwähnten oder gestützt darauf bewilligten Stoffe. Allgemein gilt der Grundsatz, dass Rückstände von Fremdstoffen in Lebensmitteln nur soweit vorhanden sein dürfen, als sie die menschliche Gesundheit nicht gefährden können und technisch nicht vermeidbar sind. Da in der Schweiz Rückstände von Beruhigungsmitteln im Fleisch bisher nicht als zulässig erklärt und keine Toleranzwerte festgelegt worden sind, gelten sie als unzulässig. Sie dürfen in nachweisbaren Mengen im Fleisch nicht vorkommen.

In Deutschland wurde die gesetzliche Situation im Zusammenhang mit der Revision des Arzneimittelgesetzes von verschiedenen Autoren eingehend beleuchtet (Fischer, Kotter und Kreuzer, 1975; Zacharias, 1975; Schlatterer, 1977; Wenzel, 1971; Russ, 1974 und Grossklaus, 1973).

In Frankreich gibt der Service Central de la Pharmacie et des Médicaments, Bureau de la Pharmacopée (1977) provisorische Toleranzwerte und Wartezeiten für verschiedene Arzneimittel (Antibiotica, Anthelminthica, Hormone, Spurenelemente und Beruhigungsmittel) an.

1.2. Rückstandsproblem

Die Rückstandsbildung ist ein Teilgebiet der Pharmakokinetik. Diese beschäftigt sich mit den zeitlichen Konzentrationsverläufen in den verschiedenen Kompartimenten (z.B. Blut, Gewebe, Intrazellulärraum, Gehirn), den Resorptions-, Verteilungs-, Metabolisierungs- und Eliminationsvorgängen. Die Fleischhygiene wird sich in Zukunft vermehrt mit dieser Disziplin beschäftigen müssen.

Eng verbunden mit der Rückstandsfrage ist die Toxikologie. Sie hat abzuklären, welche Stoffe in welchen Dosen bei Mensch und Tier zu Schädigungen führen oder führen können. Wichtige Begriffe aus der Toxikologie sind z.B.: No effect level (geringste Dosis, die gerade keine Wirkung mehr zeigt), admissible daily intake (ADI) (mit Hilfe von Sicherheitsfaktoren multiplizierte, höchste annehmbare Tagesdosis), LD₅₀ (Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere stirbt), etc.

Ueber die Zusammenhänge zwischen Toxikologie und Rückstandsfragen orientieren Schlatterer, 1977; Mercer et al., 1977; Nouws und Ziv, 1978; Trembly et al., 1978; Booth und Holt, 1976; Lewi et al., 1970; Grossklaus, 1973. Mit der Rückstandsfrage allgemein befassen sich unter anderen Hamm, 1975; Hapke, 1977; Leistner, 1976. Ein Schema zur Ermittlung von tolerierbaren Höchstmengen von Rückständen in Lebensmitteln ist auf Abb. 1 dargestellt.

Bei der Festlegung von Absetz- und/oder Wartezeiten sollte die Arbeit von Nouws und Ziv (1978) berücksichtigt werden. Sie bezieht sich auf Rückstände in mit Beta-Lactam-Antibiotica (z.B. Penicillin) behandelten Tieren und zeigt, dass bei krank geschlachteten Tieren die errechneten Wartezeiten für Muskel 2-3 mal, für Nierengewebe 4-5 mal verlängert werden müssten; d.h. die Ausscheidungszeiten sind bei kranken Tieren beträchtlich verlängert.

1.3. Uebersicht über die Psychopharmaka

Zu den Psychopharmaka gehören Stoffe, die vor allem Bewusstsein, Stimmung und Verhalten ändern. Häufig beeinflussen sie zusätzlich das vegetative und motorische Nervensystem. Bei der Einteilung der Psychopharmaka herrscht eine Uneinheitlichkeit in der Nomenklatur, die historisch bedingt ist. So erscheinen viele Synonyme wie z.B. für die Gruppe der Tranquillizer: "Minor tranquilizer, Neuroplegika, Psychoplegika und Antipsychotika". Eine einfache Uebersicht publizierten Fischer, Kotter und Kreuzer, 1975; (siehe Abb. 2).

In der Tiermedizin häufig gebrauchte Psychopharmaka sind auf Tabelle 1 zusammengestellt.

Zur Beruhigung von Schweinen vor dem Transport und der Schlachtung wird in erster Wahl Azaperon (Stresnil^R) verwendet, in zweiter Wahl kommen Propionylpromazin (Combelen^R) und Acepromazin (Vetranquil^R, Sedalin^R) zum Einsatz. Die Verwendung von Diazepam und Chlordiazepoxid ist noch zu teuer.

1.4. Einsatz von Beruhigungsmitteln beim Schlachtschwein

Schweine sind für Stress sehr anfällig. Schlecht und Pfund (1972) sehen die Ursachen für Verluste in der Schweinehaltung durch Stressfaktoren in der psychischen Labilität des Schweines. Sie zählen auch Stressoren auf, wie schlechte Stall- und Klimaverhältnisse, hohe Besatzdichte, Umgruppieren, Transporte etc. Viele Autoren führen die Stressanfälligkeit der Schweine auf einseitige züchterische Selektion (möglichst grossen Tageszuwachs) sowie auf die industriellen Haltungsformen zurück (Russ, 1974; Zacharias, 1975; Wenzel, 1971; Eiklenboom, 1972; Pohlchristoph, 1977).

Für die Fleischverwertung wirken sich Gewichtsverluste, Tod beim Transport, vor der Schlachtung und postmortale Fleischveränderungen (PSE-, DFD-Fleisch) aus.

a) Gewichtsverluste:

Symoens (1970) errechnete einen Gewichtsverlust während des Transportes von 1,5 - 2 % des Körpergewichtes. Nach persönlicher Mitteilung von Herrn Prof. Kreuzer, München, beträgt in Deutschland der Gewichtsverlust ca. 2,5 - 3 % bei maximalen Transportzeiten von zehn Stunden. Zahlen aus der Schweiz sind nicht bekannt. Diese Gewichtsverluste können somit in der Schweinemast zu einer spürbaren Verminderung der Rendite führen.

b) Todesfälle auf dem Transport und in den Schlachthöfen:

Löhr (1971) stellte im Jahre 1970 an den Schlachthöfen München und Karlsruhe Todesfälle bei 1,36 bzw. 1,18 % der Schweine fest. Im Schlachthof Basel starben 1978 0,136 % der Schweine vor der Schlachtung, im Schlachthof Zürich 0,14 % der Schweine (laut Jahresberichten der Schlachthöfe). Allgemein hat die Mortalität der Schweine vor der Schlachtung in den letzten 20 Jahren zugenommen (Pohlchristoph, 1977; Zacharias, 1975; Theloe, 1975; Russ, 1974; Devloo et al., 1972; Symoens, 1970).

c) Fleischveränderungen:

Auf die Ursachen und das Vorkommen von Qualitätsabweichungen beim Schweinefleisch (PSE- und DFD-Fleisch) weisen zahlreiche Autoren hin. Genetische Disposition in Form von Stressempfindlichkeit auf äussere Belastungen und Umweltseinflüsse, die vor dem Schlachten als Stress auf das Tier einwirken, können daher bereits beim lebenden Tier zu einer Entgleisung des Muskelstoffwechsels führen, was sich nach dem Tode in überstürzter Glycolyse (PSE) oder Glycogenmangel (DFD) auswirken kann. Dadurch wird die Fleischreifung gestört und das Wasserbindungsvermögen des Muskelfleisches sowie die pH-Werte werden verändert. Solches Fleisch ist qualitativ minderwertig und kann nur zu wenigen Fleischsorten verarbeitet werden (Russ, 1974; Devloo, Geerts und Symoens, 1971/72; Bendall und Lauwries, 1964; Schlecht und Pfund, 1972; Somers et al., 1977; Ahern et al., 1977; Nyffeler, 1978).

Zur Vermeidung dieser Nachteile empfehlen viele Autoren den Einsatz von Psychopharmaka (Kotter, 1973; Devloo et al., 1972; Schlecht und Pfund, 1972; Casteels et al., 1969; Symoens, 1970; Devloo, Geerts und Symoens, 1971; Oldings und Unshelm, 1971; Kaemerer, 1961; Cerne, 1965; Th  ret et al., 1972; Eiklenboom, 1975).

Ernste Bedenken und teilweise gänzliche Ablehnung äussern Grossklaus, 1973; Wenzel, 1971; Beyer, 1971; Pohlchristoph, 1977.

1.5. Stresnil^R (Azaperon)

Azaperon wurde von der Firma Janssen AG, Pharmazeutica, Beerse, Belgien, erstmals synthetisiert. Es ist ein Neuroleptikum aus der Reihe der Butyrophenone und ein sehr naher Verwandter des in der Humanmedizin verwendeten Haloperidols. Strukturformel und eine kleine Charakterisierung befinden sich auf Abb. 3. Massenspektrogramme einiger Butyrophenone, darunter auch Azaperon, geben Frigerio und Rovere (1972) und Rauws et al. (1976) an.

1.5.1. Pharmakologie und Toxikologie

Beim Schwein bewirkt Azaperon, wie die Phenothiazinderivate, bereits wenige Minuten nach einer intramuskulären Injektion eine Sedation. Die Wirkung wird durch Fentanyl (ein Analgetikum vom Morphintyp) potenziert. Die maximale Wirkung tritt nach etwa 15 Minuten ein und dauert 3-8 Stunden. Nach 16 Stunden ist praktisch keine pharmakologisch aktive Substanz mehr im Gehirn anzu- treffen (Symoens et al., 1969; Marsboom, 1969; Symoens, 1970).

Azaperon hat kaum Nebenwirkungen auf Herzfrequenz, Herzminutenvolumen oder Aortenfliessgeschwindigkeit. Im Gegensatz zu Propionylpromazin treten in therapeutischen Dosen keine paradoxen Reaktionen wie Rastlosigkeit, Exzitation oder Allotriophagie auf. Bei Ratten hat Azaperon nur 1/20 der antiadrenergen Wirkung

von Propionylpromazin, ist aber 60 mal wirksamer, um einen traumatischen Schock zu vermeiden (Marsboom, 1969). Die Dosis-Wirkungsbeziehungen sind auf Tabelle 2 dargestellt.

Niemegeers et al. (1974) verglichen verschiedene Wirkungen des Azaperons mit jenen von Promazin, Chlorpromazin und Haloperidol an Ratten, Mäusen und Hunden. Sie kommen zum Schluss, dass Azaperon eine Verbindung mit hervorragender Aktivität gegen Aggressivität und Schock bei Tieren ist. Marsboom (1969) empfiehlt eine Kombination des Azaperons mit dem Analgetikum Fentanyl zum Einfangen von Wildtieren.

Die t h e r a p e u t i s c h e B r e i t e ist nach Marsboom (1969) sehr gross (1000-fache Spannweite von der niedrigsten Wirkdosis bis zur Letaldosis).

A n g r i f f s p u n k t e des Azaperons sollen nach Symoens (1970) Synapsen auf der Höhe der Formatio reticularis sein. Dabei wird eine Hemmung der Reizübertragung vermutet. Azaperon hat wahrscheinlich an der synaptischen Membran die gleiche Wirkung wie die strukturell ähnliche Gamma-Aminobuttersäure und verhindert zudem die Katecholaminwirkung.

T o x i k o l o g i e d e s A z a p e r o n s : Marsboom berichtete anlässlich des Symposiums "Stress beim Schwein" (1970) in Beerse, Belgien, über die Toxizität und das Rückstandsverhalten von Azaperon. LD₅₀-Werte sind auf Tabelle 3 zusammengestellt. Die LD₅₀-Werte von Azaperon und Azaperol betragen nach Rauws et al. (1976) bei der Ratte nach intraperitonealer Injektion 150-200 mg/kg KG.

Chronische Toxizität: Marsboom (1970) stellte nach dreimonatiger Zufuhr von hohen Dosen von Azaperon an Ratten keine schädigende Wirkung auf Organe, Gewebe, sowie keine Veränderung der Blut- und Urinbeschaffenheit fest.

Embryotoxizität: Versuche mit trächtigen Ratten (2,5; 10 und 40 mg/kg s.c. täglich) ergaben keinerlei Anzeichen für eine teratogene Wirkung des Azaperons (Marsboom, 1970).

Toxikologische Untersuchungen über Azaperon am Menschen sind uns nicht bekannt. Nichtveröffentlichten Mitteilungen (Marsboom, 1977) der Firma Janssen, Pharmazeutica, Beerse, sind Berechnungen zu No-effect-level, ADI und über Rückstände zu entnehmen:

No-effect-level: 10 mg/kg (oral)

ADI: $\frac{10 \text{ mg/kg}}{100} = 0,1 \text{ mg/kg} \times 60 \text{ kg} = 6 \text{ mg}$

1.5.2. Pharmakokinetik

Von den in der Veterinärmedizin zum Einsatz kommenden Psychopharmaka ist die Pharmakokinetik des Azaperons eine der am besten untersuchten.

R e s o r p t i o n u n d V e r t e i l u n g : wurden vorallem von Heykants et al. (1971), mit Tritium markiertem Azaperon bei Ratten und Schweinen untersucht. Einige Resultate sind auf Tabelle 4 zusammengefasst.

Resorption, Metabolisierung und Ausscheidung von Azaperon illustrieren die Abbildungen 5 und 6. Weitere Literatur dazu: Lewi et al., 1970; Janssen und Allewijn, 1969; Marsboom, 1969; Soudijn et al., 1967.

M e t a b o l i s m u s u n d E x k r e t i o n : Der Metabolismus des Azaperons wurde vor allem an Ratten studiert. Die wichtigsten Metabolisierungsschritte sind nach Heykants et al. (1971) und nach Rauws und Olling (1976) oxydative N-Dearylierung (Ratte), oxydative N-Dealkylierung (Ratte) und Reduktion zu Carbinolen (Kaninchen, Schwein).

Beim Schwein wurde von Rauws et al. (1976; 1978) als Hauptmetabolit das durch Reduktion des Azaperons entstandene Azaperol entdeckt. Bereits kurze Zeit nach einer Azaperoninjektion wurde mehr Azaperol als Azaperon gefunden. Es schien, dass für die Ausscheidung die Umwandlung in Azaperol limitierend war. Einige Angaben über Azaperol finden sich auf Abbildung 4.

Nach Heykants et al. (1971) und Rauws und Olling (1978), wurden keine Anhaltspunkte dafür gefunden, dass der Metabolismus nach dem Tode weitergeht. Auch nach Pasteurisation (30 min bei 80° C für Schinken und 1 Stunde bei 80° C für Leber) blieben die Werte unverändert.

Der Metabolismus des Azaperons wurde unseres Wissens beim Menschen nicht untersucht, da es nicht für humanmedizinische Zwecke verwendet wird. Die Pharmakokinetik anderer Butyrophenone ist jedoch bekannt (Lewi et al., 1970; Janssen und Allewijn, 1969; Soudijn et al., 1967; Delay, 1960). Dabei sind auch bei länger dauernder Anwendung von Butyrophenonen beim Menschen keine Organtoxizität und keine Kumulation festgestellt worden.

1.5.3. Spezielle Untersuchungen über Rückstände im Fleisch

Parallel zu den Arbeiten der Mitarbeiter der Firma Janssen, Pharmaceutica, Beerse, über die Pharmakologie des Azaperons führten Rauws und Olling (1978) Untersuchungen über das Vorkommen von Azaperonrückständen im Fleisch durch. Sie berichten über Modell- und Felduntersuchungen in den Niederlanden, bei denen sie in 22 und 27 Proben aus dem Schlachthof Oss (Schweine, die in der Provinz Noord Brabant gemästet wurden) durchschnittlich $0,12 \pm 0,05 \mu\text{g/g}$ Azaperon und $0,30 \pm 0,26 \mu\text{g/g}$ Azaperol in den Nieren gefunden haben. Bei Proben, die von aus der Bundesrepublik Deutschland importierten Schweinen stammten, fanden sie kein Azaperon, dagegen gelegentlich Rückstände des Phenothiazins Propionylpromazin (Olling et al., 1977). Gewebskonzentrationen von Azaperon und Azaperol nach einmaliger Gabe von $0,4 \text{ mg/kg KG}$ Azaperon, 15 min respektive 1 Stunde nach Injektion finden sich auf Tabelle 5.

Die Untersuchungen von Rauws und Olling umfassen auch Fleischprodukte, wie pasteurisierte Nieren, konservierte und pasteurisierte Leberstücke und Teile von injektionsnahen und -fernen Stellen von Versuchsschweinen, die vorher mit $0,4 \text{ mg/kg}$, resp. 4 mg/kg KG Azaperon behandelt wurden. Von den gleichen Tieren wurden unbehandelte Proben mitgeführt, wobei keine klare Zeitabhängigkeit in der

Rückstandsbildung gefunden wurde, da grosse individuelle Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchstieren auftraten. Die höchsten Konzentrationen an Azaperon/-ol wurden in den Nieren gefunden, wobei die Azaperolkonzentrationen jedoch immer höher als die von Azaperon waren. Nach der Verarbeitung zu Fleischwaren konnte keine Veränderung der gefundenen Werte festgestellt werden. Die Resorption von der Injektionsstelle dauerte relativ lang.

1.5.4. Einfluss des Azaperons auf die Fleischbeschaffenheit

In dieser Frage herrscht keine Einigkeit. Russ (1974) beschrieb die Wirkung einer Dosis von 80 mg, resp. 120 mg Azaperon pro Schwein vor Transportbeginn. In allen Versuchsreihen war die Temperatur des Fleisches der behandelten Tiere signifikant herabgesetzt. Die pH-Werte nach 45 min post mortem lagen z.T. bei den behandelten Tieren etwas höher; die Unterschiede waren jedoch nicht immer statistisch abzusichern. Farbhelligkeitswerte und Wasserverbindungsvermögen waren 45 min nach der Schlachtung nur bei einer Dosierung von 120 mg Azaperon pro Tier verbessert. Nach 24 Stunden ergab sich bei einer Dosierung von 40 mg Azaperon nur für die pH-Werte und das Wasserbindungsvermögen im *M. longissimus dorsi* eine statistisch gesicherte Verbesserung zugunsten der behandelten Tiere, während pH- und Farbhelligkeitswerte im *M. adductor* der unbehandelten Tiere sogar günstigere Werte aufwiesen. Zwischen den Kochschinken der Azaperon- und der Kontrollgruppe konnten während und nach dem Produktionsprozess keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Auch die übrigen zur Charakterisierung der Fleischqualität herbeigezogenen Parameter zeigten keine wesentlichen Unterschiede.

Padberg äusserte schon 1972 den Verdacht, dass Azaperon einen ungünstigen Einfluss auf die pH-Werte bei Schlachtschweinen haben könnte.

Janitz und Pyrez (1975) fanden bei Schweinen, die 2 Stunden vor der Schlachtung 15 mg/kg KG Stresnil^R intramuskulär erhalten hatten, in den ersten 3 Tagen nach der Schlachtung eine verzögerte

Proteolyse im Fleisch. Am dritten Tag post mortem wurden ein erhöhter Wassergehalt und eine erhöhte Zahl freier SH-Gruppen gefunden.

Mc Loughlin und Heffron (1975) fanden bei Versuchen an Kaninchen und Schweinen nach Azaperongaben erhöhte Konzentrationen von Kreatinphosphat (direkt post mortem) im *M. longissimus dorsi* und im *M. semitendineus*. Azaperon erhöhte bei beiden Tierarten den pH-Wert des Muskels anfänglich erheblich.

Die Arbeiten von Somers et al., 1977; Devloo et al., 1971; 1972; und von Oldings und Unshelm, 1971, bestätigen im Wesentlichen das oben Angeführte.

2. PROBLEMSTELLUNG

Die Anwendung von Azaperon (Stresnil^R) zur Beruhigung von Schlachtschweinen ist in der Schweiz gesetzlich verboten. Um den Vorschriften Nachachtung verschaffen zu können, sind mehrere, voneinander unabhängige Nachweismethoden nötig. Wir haben uns in der vorliegenden Arbeit zum Ziel gesetzt, die Leistungsfähigkeit verschiedener gängiger Methoden zu prüfen. Da Nieren erfahrungsgemäss hohe Arzneimittel- und Metabolitenkonzentrationen enthalten und beim Schwein unter Schlachthofbedingungen schnell und ohne Kosten zu beschaffen sind, haben wir den Nachweis auf dieses Organ beschränkt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Tiermaterial

Wir verwendeten veredelte Landschweine aus bäuerlicher Haltung von ca. 100 kg Lebendgewicht, die noch nie Azaperon erhalten hatten.

3.2. Bezugssubstanzen und Eichlösungen

Azaperon wurde uns von der Firma Janssen, Beerse, Belgien, als Reinsubstanz zur Verfügung gestellt (Massenspektrogramm siehe Abbildung 33). Für den Schweineversuch verwendeten wir handelsübliches Stresnil^R (Lot Nr. 78A05/736).

Azaperol wurde aus Azaperon-Reinsubstanz durch Reduktion mit Natriumborohydrid (Methode nach Rauws und Olling, laut persönlicher Mitteilung) folgendermassen hergestellt:

1 g Azaperon wurde in 50 ml Methanol gelöst und 3 g NaBH_4 zugegeben. Die Reaktion startete unter Gasentwicklung. Nach ca. 15 Min. war diese Gasentwicklung beendet, und die Lösung wurde mit Wasser auf 300 ml ergänzt. Das gebildete Azaperol wurde mit 100 ml Chloroform extrahiert, die Chloroformphase abgetrennt und bei 40°C unter atmosphärischem Druck zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 ml Methanol aufgenommen, anschliessend wurden 20 ml Wasser zugefügt und das Ganze für 16 Stunden bei $+4^\circ \text{C}$ in einem Kühlschrank stehen gelassen. Darauf wurden die gebildeten Kristalle aus der Lösung entfernt und solange umkristallisiert (durch Lösen in 2 ml Methanol, unter Erwärmen und anschliessendem Zufügen von 8 ml Wasser), bis ein konstantes Schmelzintervall von $104 - 107^\circ \text{C}$ (Bestimmung in einer Apparatur nach Dr. Tottoli) erreicht wurde. Die Ausbeute betrug ca. 70 %. Die Identität des in der HPLC * Analyse als Reinsubstanz erscheinenden Azaperols wurde durch Massenspektrographie erhärtet (MS siehe Abbildung 34).

Diazepam (Valium^R) erhielten wir von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, als Reinsubstanz.

Zur Herstellung der Eichlösungen wurden die Substanzen in Äthylacetat gelöst. Die Einwaage erfolgte auf einer Mettler Präzisionswaage H 31 mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1 \text{ mg}$. Zur Herstellung einer Stammlösung wurden jeweils ca. 40 mg in 100 ml Messkolben ($\pm 0,2 \%$) eingewogen. Die weitere Verdünnung erfolgte mit Vollpipetten ($\pm 0,2 \%$) in 50 ml oder 100 ml Messkolben. Es wurden zwei Serien Eichlösungen, eine für die HPLC und eine für die GC hergestellt. Die Lösung für den internen Standard wurde in einem 1000 ml Messkolben angesetzt. Es wurden 8 Eichlösungen im Konzentrationsbereich zwischen 2 und $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ verwendet.

3.3. Extraktionsmethode

Wir verwendeten im Wesentlichen die Methode von Rauws et al. (1976). Abbildung 7 zeigt ein Fliessdiagramm der Aufarbeitung.

* HPLC-Bedingungen siehe 3.6.

3.4. Dünnschichtchromatographie

Platten: Merck HPTLC-Fertigplatten Art. Nr. 13727 Kieselgel 60 F 254 mit Konzentrierungszone, 10 x 10 cm Glasplatten

Entwicklungskammer: Camag Doppelkammer

Laufmittel: Aceton, 10 ml pro Kammerhälfte

R_f-Werte: Azaperon ca. 0,63; Azaperol ca. 0,43

Vorgehen: Am Schluss aller Analysen mit GC und HPLC wurde der Rest der noch vorhandenen Probe mit der wieder aufgefangenen Probe aus der HPLC vermischt, zur Trockenheit eingedampft und erneut in einer möglichst kleinen Menge Methanol aufgenommen. Der ganze Rest wurde sukzessive mit einer 10 Mikroliterspritze unter ständigem Trocknenlassen aufgetragen.

Kammersättigung: Jeweils 5 min vor dem Einbringen der Platten in die Cuvette wurde diese mit dem Laufmittel gefüllt und anschliessend mit dem Deckel verschlossen.

Entwickeln der Platten: die Platten verblieben jeweils 12 min in der Kammer, wurden anschliessend 15 min luftgetrocknet und darauf mit Dragendorff'schem Reagens (Wismuthjodid/Essigsäure, nach Pharmacopoea Helvetica VI) besprüht. Die Farbempfindlichkeit ist jener im UV-Licht vergleichbar.

Anders ist dies jedoch, falls nicht nur nach Azaperon gesucht wird. So reagieren z.B. Diazepam und einige Phenothiazine wenig mit Dragendorff'schem Reagens, sind jedoch unter der UV-Lampe sehr gut erkennbar. Das Phenothiazin Propionylpromazin hat sogar eine Eigenfluoreszenz. Es empfiehlt sich daher, falls der gesuchte Stoff nicht bekannt ist, die Platte vorerst unter der UV-Lampe zu betrachten, sich die Flecken anzuzeichnen, und dann je nach vermutetem Stoff spezifisch anzufärben.

Die quantitative Auswertung mit einem UV-Scanner könnte eine Verbesserung der Resultate herbeiführen. Dies wurde von uns jedoch nicht untersucht.

Nachweisgrenze mit Reinsubstanzen: Azaperon: ca. 20 ng
Azaperol: ca. 40 ng

Die Auswertung der Dünnschichtplatten erfolgte durch Vergleich der Flecken der Proben mit solchen bekannter Konzentrationen. Es ging uns hier nicht um einen möglichst quantitativen Nachweis als vielmehr um eine Ja/Nein-Aussage. Da ein Gemisch von wieder-aufgefangener Probe aus der HPLC und der Ausgangsprobe untersucht wurde, waren Rückschlüsse auf die Konzentration der Probe unmöglich.

3.5. Gaschromatographie

3.5.1. Gaschromatographie mit gepackter Säule

Die Methode wurde mit geringen Änderungen von Rauws et al. (1976) übernommen.

Gaschromatograph:	Carlo Erba, Fraktovap GI 450
Detektor:	Carlo Erba, Alkaliflammendetektor mit KCl
Säule:	Gepackte Pyrex-Glassäule (1,5 m x 3 mm)
Stationäre Phase:	3 % OV-17 auf Gaschrom Q (100-120 mesh), Supelco
Trägergas:	Argon 40 ml/min - 1,8 bar
Luft:	300 ml/min - 1,5 bar
Wasserstoff:	32 ml/min - 0,75 bar
Temperaturen:	Einspritzblock und Detektor: 300° C Säule: 280° C

Mit der gepackten Säule wurde ausschliesslich isotherm gearbeitet.

Interner Standard:	Diazepam, 14,5 ng/µl
Retentionszeiten:	Diazepam 3,3 min Azaperon 5,9 min Azaperol 6,8 min

Die Nachweisgrenze des Detektors betrug mit Reinsubstanz für Azaperon und Azaperol 2 ng (Injektionsvolumen 1 µl).

Probenaufgabevolumen:	4 µl, Dosierung mit einer 10 µl Spritze Marke Hamilton
Lösungsmittel:	Aethylacetat

Eichungen: Es wurde nach der Methode mit internem Standard gearbeitet. Zu Beginn eines Tages wurde eine Serie Eichlösungen nacheinander analysiert. Nach jeder Probe wurde eine Referenzprobe im gleichen Konzentrationsbereich chromatographiert. Am Ende des Tages wurde erneut eine Serie Eichungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten an vier aufeinanderfolgenden Tagen. Die entsprechenden Eichkurven sind in den Abbildungen 13, 14, 26 und 27 aufgeführt.

Erfassung der Peakflächen, resp. Areawerte: Die Areawerte wurden mit einem Integrator Marke Infotronics Modell CRC-208 erfasst.

Statistik: Da der Verlauf der Korrekturfaktoren* bei der GC mit gepackter Säule im Arbeitsbereich annähernd linear war (vergl. Abbildungen 26 und 27), entschlossen wir uns, die Areawerte folgendermassen zu standardisieren:

$$\frac{\text{Area Probe}}{\text{Area Standard}}$$

Die Logarithmen obiger Quotienten trugen wir auf die y-Achse auf und auf die x-Achse die Konzentrationen.

Die Auswertung erfolgte durch Berechnung einer einfachen, linearen Regressionsgeraden anhand der Eichwerte (mit einer Olivetti Tischrechenmaschine). Eine graphische Darstellung der Regressionsgeraden und der oberen 1 % Schranken der F-Verteilung (Vertrauensbereich) ist aus den Abbildungen 13 und 14 ersichtlich.

Beim Arbeiten mit der gepackten Säule beobachteten wir, dass das Azaperol sehr leicht im chromatographischen System zurückgehalten wird, und - wenn überhaupt - nur zu einer Erhöhung der Basislinie unter dem Azaperon führt. Nachstehende Punkte sind zu beachten:

- Bei den Säulenanschlüssen nur Dichtungen mit genügender Hitze-resistenz verwenden. O-Ringe sind nicht geeignet. Gut bewährt haben sich, auch wegen der langen Lebensdauer, Graphitferrules, z.B. Supelco Supeltex M-4
- Septen mit genügend hoher Temperaturbelastbarkeit verwenden (mind. 300° C)

$$\text{*Korrekturfaktor KF} = \frac{\text{Fläche Standard} \times \text{Gewicht Probe}}{\text{Gewicht Standard} \times \text{Fläche Probe}}$$

- Nur silylierte Glaswolle zum Verschliessen der Säule verwenden
- Vor dem Packen der Glassäule ist diese gut zu silylieren (z.B. mit Supelco Sylon CT)
- Ev. silylieren des Azaperols selbst (Derivatisieren)

Die Abbildung 17 zeigt ein Chromatogramm der Trennung von Azaperon, Azaperol und Diazepam (Reinsubstanzen); Abbildung 18 ein Chromatogramm vom Extrakt aus der rechten Niere von Schwein Nr. 9, 22 Stunden 35 min nach intramuskulärer Applikation von 0,4 mg/kg Azaperon.

3.5.2. Gaschromatographie mit Kapillare

Gaschromatograph:	Carlo Erba, Fraktovap 2101 AC
Detektor:	Carlo Erba, Flammenionisationsdetektor
Säule:	Glaskapillare, 23 m, i.D. 0,28 mm, n = 70000
Stationäre Phase:	OV-17
Trärgas:	Wasserstoff, Vordruck: 0,7 bar
Brenngas:	Wasserstoff, Vordruck: 0,4 bar Luft, Vordruck: 0,75 bar

Der Gaschromatograph war mit einer Septumspülung und einer Stromteilung versehen, die jedoch zur Injektion geschlossen wurde.

Temperaturen:	Einspritzblock und Detektor: 300° C Ofen: Programm: Einspritzen bei 240° C, 3 min isotherm, darauf mit 10°/min aufheizen bis 260° C, dann weiter isotherm.
Interner Standard:	Diazepam, 14,5 ng/µl
Retentionszeiten:	Diazepam: 6,6 min Azaperon: 10 min Azaperol: 12 min
Eichkurven:	sind auf den Abbildungen 15,16,28 und 29 dargestellt.
Nachweisgrenzen:	Azaperon 8 ng bei einem Einspritzvolumen von 1 µl

Azaperol 8 ng bei einem Einspritzvolumen von 1 µl

Einspritzvolumen: 1,7 µl mit einer 10 µl-Spritze Marke Hamilton, Bonaduz

Lösungsmittel: Aethylacetat

Es wurde nach der Methode mit internem Standard gearbeitet.

Die Abbildung 19 zeigt die Trennung der Reinsubstanzen Azaperon, Azaperol und Diazepam. Die Abbildung 20 zeigt das Chromatogramm der Probe Nr. 9 R (Schwein Nr. 9, rechte Niere, 22 Stunden 35 min nach Applikation von 0,4 mg/kg Stresnil^R, intramuskulär).

Eichungen: Die Eichungen erfolgten auf die selbe Weise, wie unter 3.5.1. beschrieben. Die entsprechenden Eichkurven sind in den Abbildungen 15,16,28 und 29 aufgeführt.

Erfassung der Peakflächen, resp. Areawerte: Da im Bereich der Nachweisgrenze gemessen werden musste, konnte kein Integrator verwendet werden. Die Peakflächenberechnung erfolgte nach der Formel:

$$F = \text{Peakhöhe} \times \text{Halbwertsbreite}$$

Statistik: Bei der GC mit Kapillarsäule potenzierten sich verschiedene ungünstige Faktoren. Zum einen war das Verhältnis Area int. Standard zu Area Probe ungeeignet, infolge der unterschiedlichen Responsefaktoren von FID und Alkali FID. Der interne Standard sollte ungefähr in der gleichen Grössenordnung wie die Probe liegen. Zum andern waren die Konzentrationen der Proben für so kleine Aufgabemengen, wie sie beim Arbeiten mit der Kapillare üblich sind, zu klein. Dadurch musste so nahe an der Nachweisgrenze gearbeitet werden, dass eine Auswertung der Chromatogramme mit einem Integrator unmöglich wurde (zu geringer Slope). Auch die Eichkurve verlief nicht mehr linear (vergl. Abbildungen 15,16,28 und 29). Die Auswertung der von Hand berechneten Peakflächen erfolgte anhand einer Eichkurve mit Korrekturfaktoren. Diese berechnen sich nach folgender Formel:

$$KF = \frac{\text{Fläche Standard} \times \text{Gewicht Probe}}{\text{Gewicht Standard} \times \text{Fläche Probe}}$$

Der Verlauf der KF-Werte für Azaperon und Azaperol ist in den Abbildungen 26 und 27 dargestellt.

Zum Ausrechnen der Probenkonzentrationen wurde obige Gleichung nach dem Gewicht der Probe aufgelöst und die aus der Eichkurve entnommenen KF-Werte des ungefähr entsprechenden Konzentrationsbereiches eingesetzt.

Aus den gleichen, oben angeführten Gründen konnten bei der Recoveryuntersuchung die mit GC Kapillare erhaltenen Werte von Azaperol unter 20 ng/µl nicht mehr ausgewertet werden. Als weiterer ungünstiger Faktor kam hier noch die Peakverbreiterung hinzu.

3.6. High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC)

Pumpe:	Altex 110
Detektor:	Uvikon LCD 725, Photometer mit Durchlaufcuvette
Säule:	Altex LiChrosorb Si 60, 5 µ, 3,2 x 250 mm Testchromatogramm siehe Abbildung 21.
Probeneingabe:	20 µl Schleife
Lösungsmittelgemisch:	Methanol/Dichlormethan/Aethylacetat 6/90/4 (V/V/V)
Fluss:	1 ml/min
Druck:	ca. 400 psi
Detektoreinstellung:	248 nm UV, Det. Range 0,01, Absorbtion, Time constant 2
Retentionszeiten:	Diazepam: 2,7 min Azaperon: 2,9 min Azaperol: 3,8 min

Bei der HPLC wurde nach der Methode mit externem Standard gearbeitet.

Abbildung 23 zeigt ein Chromatogramm der Reinsubstanzen. Die Nachweisgrenze ist sowohl für Azaperon als auch für Azaperol 0,1 ng (absolut) bei einem Dosiervolumen von 20 µl.

Lösungsmittel der Proben: Aethylacetat
Integrator: Autolab IVB

Der Zusatz von Aethylacetat erfolgte nur, um den störenden Einfluss des Lösungsmittelpeaks zu mildern. Werden Proben in Methanol aufgenommen, hat sich ein Gemisch von Methanol/Dichlormethan 8/92 (V/V) als sehr günstig erwiesen (vergl. Abbildung 22),

Ein Chromatogramm vom Extrakt aus der rechten Niere von Schwein Nr. 9, 22 Stunden 35 min nach intramuskulärer Applikation von 0,4 mg/kg Azaperon ist in Abbildung 24 dargestellt.

Eichungen: Es wurde mit externem Standard gearbeitet. Vor der Analyse der Proben wurde eine Serie Standardlösungen in auf- und absteigenden Konzentrationen chromatographiert. Nach jeder Probe wurde zusätzlich eine Eichlösung im gleichen Konzentrationsbereich analysiert. Am Ende der Analyse wurde wieder eine Serie Standardlösungen in gleicher Weise wie zu Beginn eingespritzt. Am Schluss wurden alle Werte zu einer Eichkurve (vergl. Abbildungen 11 und 12) zusammengefasst. Alle Proben wurden am gleichen Tag gemessen.

Erfassung der Areawerte: Erfolgte mit Hilfe eines Integrators vom Typ Autolab IVB, System 4.

Statistik: Die Auswertung der HPLC-Resultate erfolgte durch Berechnung einer einfachen, linearen Regressionsgeraden anhand der Eichwerte. Auf der y-Achse wurden die logarithmierten Areawerte aufgetragen, auf der x-Achse die Konzentrationen. Die Berechnung der Regressionsparameter erfolgte auf einer Olivetti Tischrechenmaschine. Eine graphische Darstellung der Eichkurve, der Regressionsgeraden und der oberen 1 % Schranken der F-Verteilung (Vertrauensbereich) ist aus den Abbildungen 11 und 12 ersichtlich.

Neben der Silicagel-60 Säule wurden auch je eine RP-18, eine RP-8 und eine RP-2 Säule ausprobiert.

Die Säulen RP-18 und RP-8 zeigten mit verschiedenen Verhältnissen von Wasser/Methanol keine Trennung zwischen Azaperon und Azaperol.

Will man jedoch die Summe beider Stoffe ermitteln, kann eine dieser Säulen zum Einsatz kommen. Auch mit nicht wässriger reversed-phase-chromatography konnte keine befriedigende Trennung zwischen Azaperon/-ol erreicht werden. Am günstigsten erschienen noch die Lösungsmittelgemische 10/90 Methanol/Propanol und 80/20 Dichlormethan/Methanol (V/V). Ein Grund für die misslungene Trennung auf diesen Säulen dürfte in der schlechten Löslichkeit des Azaperons in Wasser sein, weshalb Versuche mit Methanol/ KH_2PO_4 -Pufferlösungen ev. Erfolg bringen könnten.

Mit der RP-2 Säule konnte eine einigermaßen gute Trennung mit einem Lösungsmittelgemisch von 90/10 Methanol/Wasser erreicht werden (vergl. Abbildung 25). Wahrscheinlich liesse sich die Auflösung mit einer besseren Säule verbessern, da unsere Säule nur ca. 500 theoretische Böden hatte.

Allgemein empfehlen wir bei der Untersuchung von Nierenextrakten mit HPLC die Verwendung einer Vorsäule, da bereits nach ca. 40 Injektionen ein Nachlassen der Trennleistung beobachtet wurde (Si-60 Säule).

Eine Si-60 Säule sollte nur mit ähnlich polaren Lösungsmitteln beschickt werden, da sie sonst sehr rasch unbrauchbar wird.

3.7. Radioimmunoassay (RIA)

Zum Nachweis des in der Humanmedizin verwendeten Haloperidols existiert ein kommerziell erhältlicher RIA, der auch mit einigen Metaboliten und verwandten Stoffen kreuzreagiert. Hersteller: Institut National des Radioelements, 6220 Fleurus, Belgien. Vertrieb für die Schweiz: Radium-Chemie AG, CH-9053 Teufen.

Die Vermutung, dass mit dem chemisch verwandten Azaperon eine genügende Kreuzreaktion bestehe, bestätigte sich jedoch nicht. Die von einem privaten Labor (Laboratoire Riotton SA, Genf) nach Standardmethoden durchgeführten Versuche ergaben eine Kreuzreaktion mit Azaperon von 0,12 % und Azaperol von unter 0,014 %.

Die Nachweisgrenze lag damit bei ca. 1,6 µg/ml und war deshalb ungenügend (siehe dazu auch die Abbildungen 35 und 36).

3.8. Bestimmung der Ausbeuten aus Nieren

Als Ausgangsmaterial dienten Nieren von Schweinen, die kein Azaperon erhalten hatten. Azaperon und Azaperol wurden in Aethylacetat gelöst. Die Lösungen wurden den Nierenhomogenaten zugesetzt und durch erneutes Homogenisieren möglichst gleichmässig verteilt. Die Versuchsansätze sind auf Tabelle 7 zusammengestellt. Der Arbeitsprozess ist unter 3.3. abgehandelt.

3.9. Bestimmung der zeitlichen Nachweisgrenzen

Da Schweine innerhalb von Stunden nach der Anwendung von Azaperon zur Schlachtung kommen, haben wir nachgeprüft, ob Azaperon und Azaperol in den Nieren innerhalb von 24 Stunden nach der Injektion von Azaperon noch nachweisbar sind. Tabelle 6 gibt Aufschluss über die verwendeten Tiere, die Azaperondosen und die Zeitspanne zwischen der Azaperoninjektion und der Schlachtung.

Die Schlachtung erfolgte nach Betäubung durch Bolzenschuss. Zuvor waren die Tiere in einem Kleinviehanhänger ca. 1 km weit zum Schlachtlokal transportiert worden. Die Tiere wurden im Anhänger geschossen und anschliessend sofort entblutet. Unmittelbar nach dem Entbluten wurden die Tiere ausgenommen, die linke und rechte Niere halbiert, separat verpackt, angeschrieben und sofort in Trockeneis tiefgefroren. Die weitere Lagerung der Proben bis zur Aufarbeitung erfolgte in einem Tiefkühlschrank bei minus 20° C.

4. RESULTATE UND DISKUSSIONEN

4.1. Vergleich der Empfindlichkeiten und Kritik der Methoden

Auf Tabelle 11 sind die mit den Reinsubstanzen erhaltenen Nachweisgrenzen angegeben. Siehe dazu auch die Abbildungen 30, 31 und 32. Die HPLC, von uns hier erstmals angewendet, bringt also eine Erhöhung der Empfindlichkeit um den Faktor 100. Zu den einzelnen Methoden seien noch einige Bemerkungen beigefügt.

4.1.1. Dünnschichtchromatographie

In unseren Versuchen erwies sich die Dünnschichtchromatographie als gut geeignetes, einfaches und billiges Verfahren zum halbquantitativen Nachweis von Azaperon und Azaperol. Die Empfindlichkeit dürfte als genügend bezeichnet werden (mit den verwendeten Platten ca. 20 ng). Auch hier liegt der grosse Nachteil in der Notwendigkeit einer vorhergehenden Extraktion zur Anreicherung und Reinigung der Proben. Ein Vorteil ist, dass bei geeigneter Auftragstechnik Volumina bis 100 µl aufgetragen werden können, wodurch die Proben voll aufkonzentriert werden.

Im UV-Licht (254 nm) können, dank dem Fluoreszenzindikator in den Kieselgelplatten, auch nicht Dragendorff positive Substanzen nachgewiesen werden. Es ist deshalb zu empfehlen, die Platten vor dem Anfärben im UV zu betrachten.

Die Dünnschichtchromatographie eignet sich sehr gut als Screening-Methode, da in einem Durchgang bis zu 15 Proben pro Platte analysiert werden können. Sie kann aber ebenso gut mit den anderen Methoden kombiniert werden, z.B. mit immunchemischen Nachweisverfahren, zum Ausschluss falsch positiver Resultate.

4.1.2. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie hat gegenüber anderen Methoden (z.B. HPLC) den Vorteil, ein breites Spektrum von Beruhigungsmitteln gleichzeitig zu erfassen. Diese Methode eignet sich deshalb auch zum Suchen und Identifizieren unbekannter Beruhigungsmittel. Der Zeitaufwand für die Gaschromatographie selbst ist relativ gering, jedoch muss vorhergehend eine Extraktion erfolgen, die pro Probe einen Laboranten ca. einen halben Tag Arbeit kostet. Ein weiterer Nachteil der GC ist, dass ein Gaschromatograph praktisch nur für eine bestimmte Analyse eingesetzt werden kann und dass er immer in Betrieb sein sollte, um vernünftige Resultate zu liefern. Man kann ihn nicht einfach einschalten und anschliessend die Probe messen. Dies bedingt grosse Unterhaltskosten, sodass ein Gaschromatograph nur verwendet werden kann, wenn er täglich im Einsatz ist. Er ist also besser geeignet für grosse Laboratorien. Zudem ist die GC sehr störungsanfällig.

a) GC mit Kapillarsäule

Die Kapillarsäule hat bekanntlich den Vorteil einer sehr guten Trennleistung. In unserem Fall war jedoch weniger das Trennen der einzelnen Substanzen ein Problem - die Proben waren ja im Laufe der Extraktion bereits vorchromatographiert - als vielmehr genügend Probenmaterial auf die Säule zu bringen. Dazu war unser System ungeeignet. Man müsste einige technische Veränderungen vornehmen, um mit grösseren Einspritzvolumina arbeiten zu können. Auch liegt die obere Temperaturgrenze mit 250° C bei der Kapillare für diese Zwecke relativ tief. Nicht zu vergessen ist, dass wir bei unserer Aufarbeitung 10 g schwere Proben in zwei Teile geteilt und die Ausbeute aus jedem Teil in 100 µl aufgenommen haben. Würde man die ganze Ausbeute in 50 µl aufnehmen, wären die Konzentrationen 4 mal grösser, so dass auch hier in einem günstigeren Konzentrationsbereich gearbeitet werden könnte.

b) GC mit gepackter Säule

Für den Nachweis von Beruhigungsmitteln ist die gepackte OV-17 Säule sehr gut geeignet. Wegen der hohen Temperaturbelastbarkeit ist, wie schon vorher erwähnt, auf genügend hohe Hitzeresistenz von Septum und Dichtungen zu achten. Ein Vorteil der gepackten Säule gegenüber der Kapillarsäule ist in unserem Fall sicher das grössere Einspritzvolumen, insbesondere die grössere Belastbarkeit der Säule.

c) Zur Wahl des Detektors bei der GC

Es zeigte sich, dass der Alkaliflammendetektor dem gewöhnlichen Flammenionisationsdetektor in bezug auf Linearität und Empfindlichkeit überlegen ist. Jedoch ist der FID viel zuverlässiger. Durch die Verwendung eines Alkaliflammendetektors kann der Lösungsmittelpeak auf ein Minimum reduziert werden.

4.1.3. High Performance Liquid Chromatography

Von den analytisch-chemischen Methoden zum Nachweis des Azaperons scheint uns die HPLC heute die beste zu sein. Vorteile bestehen in der Möglichkeit hoher Einspritzvolumina, in der raschen Betriebsbereitschaft des Gerätes und der Säule sowie der Verwendung eines UV-Detektors, so dass unerwünschte Komponenten, die nicht bei 248 nm absorbieren, nicht erscheinen. Weiterhin ist dasselbe Gerät gleichzeitig für andere Analysen einsetzbar. Zudem kann bei Zimmertemperatur gearbeitet werden. Der grösste Vorteil der HPLC liegt in der sehr hohen Empfindlichkeit, beträgt doch die absolute Nachweisgrenze für Azaperon 0,1 ng (im Vergl. dazu GC: 2-10 ng). Auch wird die Probe durch den Analysenvorgang nicht verändert und kann daher zurückgewonnen werden. Ein Nachteil der HPLC liegt darin, dass auch sie nicht ohne zeitaufwendige Extraktion auskommt. Der UV-Detektor erfasst nur Substanzen, die bei der gewählten Wellenlänge absorbieren. Beruhigungsmittel mit anderen Absorptionsmaxima, sowie UV-negative Substanzen können nicht gleichzeitig erfasst werden (Vorteil von GC/FID gegenüber HPLC/UV).

Unser Verfahren mit Reversed Phase Säulen zum Nachweis von Azaperon bedarf noch weiterer Verbesserungen.

4.1.4. Radioimmunoassay

Der Nachweis von Azaperon und Azaperol ist mit den oben geschilderten Methoden sehr leicht und mit hoher Empfindlichkeit möglich. In der Praxis jedoch ist die aufwendige Aufarbeitungsmethode ein gravierender Nachteil. Urin wäre, wie die Dopingkontrollen beim Menschen zeigen, ein ideales Ausgangsmaterial, doch dürfte er bei Schlachtschweinen nicht immer in genügender Menge zu gewinnen sein. Ein RIA, mit einem enteweißten Nierenextrakt durchgeführt, wäre eine ideale Methode. Leider war jedoch der für Haloperidol ausgearbeitete Test (siehe 3.7.) nicht brauchbar. Die Entwicklung eines RIA oder ELISA für Azaperon/ol würde sich jedoch lohnen.

4.2. Bestimmung der Ausbeuten aus Nierenhomogenat

Die Ausbeuten an Azaperon und Azaperol aus Nierenhomogenaten sind auf Tabelle 8 dargestellt. Die durchschnittlichen Werte sind in Anbetracht des komplizierten Aufarbeitungsverfahrens als gut zu bezeichnen und entsprechen jenen von Rauws et al. (1976). Die Streuungen sind jedoch recht hoch, dürften sich aber mit grösserer Erfahrung vermindern.

4.3. Bestimmung der zeitlichen Nachweisgrenzen

Die in Abhängigkeit von der Zeit in den Nieren von Versuchsschweinen nachweisbaren Mengen von Azaperon und Azaperol nach der intramuskulären Injektion von 0,4 mg/kg KG oder 1 mg/kg KG Azaperon sind auf den Tabellen 9 und 10 und den Abbildungen 8 und 9 dargestellt. Wichtigste Feststellung ist die, dass schon die sehr einfache Dünnschichtchromatographie für den Nachweis innerhalb von 24 Stunden nach der Anwendung genügen würde.

Mit den anderen Methoden könnten Azaperon und Azaperol sicher noch während vielen Tagen nachgewiesen werden.

Die grosse Streuung der Nachweismethoden und die geringe Tierzahl lassen keine Interpretation der Pharmakokinetik zu. Aus den gleichen Gründen ist nicht zu entscheiden, ob zwischen den Rückstandsmengen in den rechten und linken Nieren signifikante Unterschiede bestehen. Sicher ist, dass die Mengen in beiden Nieren so hoch sind, dass ein Nachweis mit allen Methoden möglich wird.

4.4. Vorschlag zur Ueberwachung des Fleisches auf Rückstände

In grösseren Schlachthöfen sollten einige Proben pro Lieferant erhoben werden. Diese werden mit Hilfe des immunchemischen Screening-Tests auf das Vorhandensein von Azaperon geprüft. Die positiven Proben werden weiter bearbeitet. Es folgt eine Extraktion und anschliessend ein Untersuchung mittels Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie oder HPLC. Dadurch könnten falsch positive Resultate weitgehend ausgeschlossen werden. Die Resultate des Screening Tests könnten bereits am anderen Tag vorliegen. Grenzwerte müssten vom Gesetzgeber festgelegt werden.

Eine schematische Uebersicht des Untersuchungsganges wird auf Abbildung 10 gezeigt.

4.5. Das Rückstandsproblem aus meiner Sicht

Ueber Rückstände in Lebensmitteln wird derzeit viel diskutiert. Neue Mitteilungen über gefundene Rückstände erschrecken periodisch über die Boulevardpresse und die Massenmedien die Konsumenten und verunsichern sie. Für die Konsumenten ist es oft schwer, die Gefährlichkeit der einzelnen Stoffe zu beurteilen. Rückstände hat es immer gegeben und wird es immer geben. Dass sie heute so aktuell sind, ist vorallem auf eine Verbesserung der chemischen Analytik zurückzuführen. Auch leisten Umweltschützer und Konsu-

mentenschutz ihren Teil dazu. Da man (nicht alle) Rückstände abschaffen kann, gilt es, sie nach ihrer Schadwirkung einzustufen, und mit verhältnismässigem Aufwand möglichst tief zu halten.

In der Fleischhygiene werden in Zukunft zur Verbesserung der Kontrollen vermehrt Chemiker, Tierärzte und Toxikologen zusammenarbeiten müssen. Neben der pathologisch-anatomischen Fleischschau, der Fleischbakteriologie und den fleischtechnologischen Untersuchungen sind inskünftig in grösserem Umfang chemisch-analytische Untersuchungen in die Fleischkontrolle einzubauen. Auch in diesem Gebiet findet der Tierarzt dank seiner vielseitigen Ausbildung eine interessante Aufgabe. Die tierärztliche Fleischschau sollte sich von der bisher praktisch vorherrschenden Tätigkeit der Tuberkulosebekämpfung loslösen, und anderen Gebieten zuwenden. Wird der Fleischschautierarzt durch Laienfleischschauer von Routineuntersuchungen an der Schlachtkette entlastet, so steht ihm vermehrt Zeit für Laboratoriumsuntersuchungen, sowie auch für andere wichtige Ueberwachungsaufgaben (Lebendviehschau, Tierschutz) zur Verfügung.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit wird ein Ueberblick über den Einsatz von Beruhigungsmitteln bei Schlachttieren gegeben und die gesetzliche Situation für deren Einsatz in der Schweiz kurz erläutert. Es folgt eine Literaturübersicht über Pharmakologie, Chemie, Toxikologie und Einfluss auf die Fleischbeschaffenheit des heute in der Schweinepraxis am häufigsten verwendeten Beruhigungsmittels Azaperon (Stresnil^R).

Im zweiten Teil wird anhand eines Modellversuchs mit 15 Schweinen ein Vergleich verschiedener Nachweismethoden für Rückstände von Azaperon und Azaperol in Schweinenieren angestellt. Es wird gezeigt, dass eine einmalige Applikation von 0,4 mg/kg KG Stresnil^R auch 22 Stunden nach der Verabreichung zu Rückstandskonzentrationen führt, die mittels Dünnschichtchromatographie, Gaschromatographie und High Performance Liquid Chromatography einwandfrei nachgewiesen werden können. Die HPLC - in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis des Azaperons erstmals angewendet - stellt sich dabei als die empfindlichste Methode heraus.

6. LITERATURVERZEICHNIS*

1. Ackermann H., Kretzschmann F., Krüger S. und Lexow B. (1977)
Dünnschichtchromatographisches Verfahren zur semiquantitativen
Bestimmung von Hydroxyzinrückständen in tierischem Material
Die Nahrung 21 (7), 603-610
2. Ahern C.P., Somers C.J., Wilson P. and Mc Loughlin J.V. (1977)
The prevention of acute malignant hyperthermia in halothane-
sensitive piétrain pigs by low doses of neuroleptic drugs
Proc. of the 3rd Int. Conference on Production Disease in Farm
Animals, Wageningen 1977, pp. 169-171
3. Bendail J.R. und Lawries R.A. (1964)
Wässriges Schweinefleisch. Eine Diskussion über Symptome und
Ursachen
Fleischwirtschaft 44, 411-415
4. Beyer K.W. (1971)
Fleischhygienische Beurteilung von Beruhigungsmittelrückständen
im Schweinefleisch
Bundesgesundheitsblatt 15/16 vom 6. August 1971, BRD
5. Booth N.H. and Holt A.B. (1976)
Toxicologic significance of drug and chemical residues
Ann. Rech. vétér. 7 (2), 109-113
6. Castoels M., van Hoof J. und Eeckhout B. (1969)
Der Einfluss von Azaperon auf die Fleischqualitäts-Charakteri-
stica bei Mastschweinen
Tijdschr. Diergeneesk. 94, 883-895
7. Cerne F. (1965)
Die Anwendung von Combelen^R in Schweine-Grossbetrieben
Veterinärmedizinische Nachrichten 4, 250-254
8. Devloo S., Geerts H. und Symoens J. (1972)
Einfluss von Azaperon auf die Mortalität und Fleischqualität
nach dem Transport von Schlachtschweinen
Tierärztliche Umschau 27 (6), 302-308
9. Devloo S., Geerts H. and Symoens J. (1971)
Effect of Azaperone on mortality and meat quality after trans-
port of pigs for slaughter
Proc. 2nd int. Symp. Condition Meat Quality Pigs, Zeist, 1971,
Pudoc, Wageningen
10. Eiklenboom G. (1972)
Stress-susceptibility in swine and its relationship with energy
metabolism in skeletal musculature
Thesis Research Institute for Animal Husbandry "Schoonoord"
Zeist, The Netherland; IVO-Report B-110

* Abkürzungen der Zeitschriften-Namen nach "Current Contents",
21 (40), 208-218 (1978)

11. Eiklenboom G. (1975)
Toepassing van neuroleptica in de moderne varkenshouderij
Tijdschr. Diergeneesk. 100 (5), 266-269
12. Fischer A., Kotter L. und Kreuzer W. (1975)
Zur Problematik des Einsatzes von Psychopharmaka bei Schlacht-
tieren
Rückstände in Fleisch und Fleischerzeugnissen
Harald Bolt-Verlag, Boppard 1975
ISBN 37646 1635 0
13. Fleischle W. (1977/78)
Arzneimittleinsatz in der Geflügelproduktion und Rückstände im
Ei und Geflügelfleisch
Berichte aus der Landwirtschaft 55, 855-864
Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, ISBN 005-9080
14. Eidgenössische Fleischschauverordnung
vom 11. Oktober 1957, Stand am 1. Januar 1977, SR 817.191
Eidgenössische Drucksachen- und Materialzentrale, Bern
15. Frigerio A. and Rovere C. (1972)
Mass spectrometry of some butyrophenones
Organic Mass Spectrometry 6, 1051-1058
16. Gerbig K. und Kahl P. (1978)
Prinzip und Anwendung von Enzym-Immuno-Assays unter besonderer
Berücksichtigung des Merkotest EMIT
Das medizinische Laboratorium 31 (5)
S. Hirzel-Verlag, Stuttgart
17. Grossklaus D. (1973)
Rückstandsproblematik von Arzneimitteln in von Tieren stammen-
den Lebensmitteln
Schlacht- und Viehhof-Zeitung 73 (3), 79-84
18. Hamm R. (1975)
Allgemeine Bemerkungen über Rückstände in Fleisch und Fleisch-
erzeugnissen
Harald-Bolt-Verlag, Boppard S. 11-18
ISBN 37646 1635 0
19. Hapke H.-J. (1977)
Chemische Rückstände im Fleisch
Rundschau für Fleischuntersuchung und Lebensmittelüberwachung
29 (3), 33-48
20. Hapke H.-J. (1976)
Beruhigungsmittel und ihr Nachweis
Tierärztliche Praxis 4, 447-452
21. Hapke H.-J. (1969)
Ein pharmakologisch begründetes System der Psychopharmaka in
der Veterinärmedizin
Tierärztliche Umschau 24 (7), 315-324

22. Heykants J., Perdoel L. and Janssen P.A.J. (1971)
On the distribution and metabolism of Azaperone (R1929) in the rat and pig. Part I
Arzneimittel Forschung (Drug res.) 21 (7), 982-984
23. Heykants J., Lewi P. and Janssen P.A.J. (1971)
On the distribution and metabolism of Azaperone (R1929) in the rat and pig. Part II
Arzneimittel Forschung (Drug res.) 21 (8), 1263-1269
24. Heykants J., Symoens J. and Marsboom R. (1971)
On the distribution and metabolism of Azaperone (R1929) in the rat and pig. Part III
Arzneimittel Forschung 21 (9), 1357-1358
25. Instruktion für die Fleischschauer vom 1. September 1962,
Stand 1. August 1976
Bundesamt für Veterinärwesen, Bern
26. Janitz W. and Pyrcz J. (1975)
The influence of the sedative drug Stresnil on the changes of proteins in pig meat after slaughter period
Medycyna Weterynaryjna 31 (6), 342-345
27. Janssen P.A.J. and Allewijn F.T.N. (1969)
The distribution of the butyrophenones Haloperidol, Trifluoperidol, Moperone and Clofluperol in rats and its relationship with their neuroleptic activity
Arzneimittel Forschung (Drug res.) 19 (2), 199-208
28. Kämerer K. (1961)
Erfahrungen bei Transportversuchen unter Combelen^R-Schutz
Vet. Med. Nachrichten 1961 (2), 51-64
29. Kotter L. (1973)
Fremdstoffe und Rückstände im Fleisch von Schweinen aus lebensmittelhygienischer Sicht
Referat bei den Hülsenberger Gesprächen 1973
30. Kronfeld D.S. (1972)
Consumer protection, veterinary medicine and new animal drugs
Journal of the American Veterinary Medicine Association, 161 (11)
31. Leistner L. (1976)
Aktuelles über Rückstände und Zusatzstoffe bei Fleisch und Fleischerzeugnissen
Die Fleischwirtschaft 56 (9), 1225-1228
32. Lewi P.J., Chandler A.E.F., van Riel D.G., Somers P.J., Allewijn F.T.N., Dony J.G.H. and Janssen P.A.J. (1970)
Computer procedures for evaluating the results of studies on the distribution and metabolism of drugs in the body
Arzneimittel Forschung (Drug res.) 20 (3), 684-693

33. Lewi P.J., Heykants J.J.P., Allewijn F.T.N., Dony J.B.H. and Janssen P.A.J. (1970)
Distribution and metabolism of neuroleptic drugs
Arzneimittel Forschung (Drug res.) 20 (7), 943-948
34. Mc Loughlin J.V. and Heffron J.J.A. (1975)
The effect of Azaperone on post-mortem changes in pig and rabbit skeletal muscle
Br. vet. J. 131, 102-107
35. Löhr J. (1971)
Mortalität von Schweinen durch Transport
Schlacht- und Viehhofzeitung 71, 191-193
36. Marsboom R. (1970)
Toxicity and residues of Azaperone
Proceedings on the Symposium on "Stress in the Pig", Beerse, Oktober 1970, pp. 20-21
37. Marsboom R. (1969)
On the pharmacology of Azaperone, a neuroleptic, used for the restraint of wild animals
Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia 48, 155-161
38. Mercer H.D., Baggot J.D. and Sams R.A. (1977)
Applikation of pharmacokinetic methods to the drug residue profile
Journal of Toxicology and Environmental Health 2, 787-801
39. Meyer V. (1979)
Praxis der Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie
1. Aufl. Verlag Diesterweg/Salle und Sauerländer-Verlag
ISBN 3-425-05452-X (Diesterweg) ISBN 3-7941-1816-2 (Sauerländer)
40. Niemegeers C.J.E., van Nueten J.M. and Janssen P.A.J. (1974)
Azaperone, a sedative neuroleptic of the butyrophenone series with pronounced anti-aggressive and anti-shock activity in animals
Arzneimittel Forschung (Drug res.) 24 (11), 1798-1806
41. Nyffeler B. (1978)
Einfluss der Beschaffenheit von Schweinefleisch auf die Stabilität und Konsistenz von Brühwurstbräten
Dissertation ETH Zürich, Nr. 6128, 1978
42. Nouws J.F.M. and Ziv G. (1978)
Pre-slaughter withdrawal times for drugs in dairy cows
J. vet. Pharmacol. Therap. 1, 47-56
43. Oldings B. and Unshelm J. (1971)
Influence of a stress reducing medical treatment before transport on meat quality of pigs
Proc. 2nd int. Symp. Condition Meat Quality Pigs, 1971, Pudoc, Wageningen, pp. 205-207

44. Padberg W. (1972)
Hat das Sedativum Azaperone einen Einfluss auf die Fleischreifung
Tierärztliche Umschau 27 (4), 174-175
45. Pattison J.B. (1972)
Programmierte Einführung in die Gas-Flüssig-Chromatographie
Vieweg-Verlag, Braunschweig
ISBN 3-528-083107
46. Pohlschrioph H. (1977)
Transportschäden bei Schlachttieren - Massnahmen zu ihrer Verhütung
Schlachten und Vermarkten 77 (4), 113-116 (Teil 1)
Schlachten und Vermarkten 77 (5), 147-151 (Teil 2)
47. Rauws A.G. und Olling M. (1978)
Residues of Azaperone and Azaperol in slaughter pigs
J. vet. Pharmacol. Therap. 1, 57-62
48. Rauws A.G., Olling M., Freudenthal J. and Ten Ham M. (1976)
Azaperol, a new metabolite of the veterinary butyrophenone tranquilizer Azaperone
Toxicology and Applied Pharmacology 35, 333-339
49. Russ P. (1974)
Zur Fleischqualität Azaperon - behandelter Schlachtschweine
Inaugural Dissertation, Vet.-med. Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
50. Schlatterer B. (1977)
Arzneimittelanwendung aus der Sicht der Rückstandsproblematik
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 84, 253-292
51. Schlecht H. und Pfund L. (1972)
Ueber die praktische Anwendung von Stresnil^R beim Schwein während der Mast und bei Transporten
Wiener Tierärztliche Monatsschrift 59 (2), 76-80
52. Schomburg G. (1977)
Taschentext 48 Gaschromatographie
1. Auflage-Weinheim, Verlag Chemie, Verlag Physik 1977
ISBN - 3-527-21048-2 (Verlag Chemie)
ISBN - 3.87664-548-4 (Physik Verlag)
53. Service Central de la Pharmacie et des Médicaments, Bureau de la Pharmacopée, 97, Bd du Montparnasse, 75006 Paris (1977)
Résidus des Médicaments Vétérinaires dans les Denrées d'Origine Animale
Réc. Méd. Vét. 153 (12) 937-940
54. Somers C.J., Wilson P., Ahern C.P. and Mc Loughlin J.V. (1977)
Energy phosphate turnover and glycolysis in skeletal muscle of the piétrains pig: the effects of premedication with Azaperone and Pentobarbitone anaesthesia
J. Comp. Path. 87, 177-183

55. Soudijn W., van Wijngaarden I. and Allewin F. (1967)
Distribution, excretion and metabolism of the neuroleptics of the butyrophenone type
European Journal of Pharmacology 1, 47-57
56. Symoens J. (1970)
Vorbeugen und Heilung von Aggressivität und Stress bei Schweinen durch das Neuroleptikum Azaperon
Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 11, 144-148
57. Symoens J. and van den Brande M. (1969)
Prevention and cure of aggressiveness in pigs using the sedative Azaperone
The Veterinary Record 85, 64-67
58. Theloe G. (1975)
Schweineverluste auf dem Transport und in den Schlachthöfen
Monatshefte für Veterinärmedizin 30 (13), 484-488
59. Théret M., Denis B. et Buffet B. (1972)
Résultat d'un essai d'administration d'un nouveau tranquillisant (décanoate de fluphénazine) chez les porcelets avant leur transport par camion
Recueil de Médecine Vétérinaire 148 (11), 1213-1223
60. Trembly K.J., Mc Kean J.B. and Lloyd E.W. (1978)
Drug residues in food animals
Iowa State University Veterinary, 40 (2), 43-46
61. Wenzel S. (1971)
Das Sedativum Azaperon für Schlachtschweine und das Fleischbeschaugesetz
Tierärztliche Umschau 26 (7), 334-338
62. Zacharias H. (1975)
Sedation von Schlachtschweinen vor dem Transport und die sich daraus ergebenden veterinärmedizinischen, rechtlichen wie fleischhygienischen Fragen
Tierärztliche Umschau 30 (12), 598-600

7. DANKESADRESSEN

Meinen herzlichsten Dank an

Herrn Prof. Dr. E. Jenny, Direktor des Institutes für Pharmakologie und Biochemie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich, für die Ueberlassung des Themas und die tatkräftige Unterstützung

Herrn Prof. Dr. H. Keller, Direktor des Bundesamtes für Veterinärwesen, Bern, für die finanzielle Unterstützung, das Zurverfügungstellen der Laboratorien, für die Durchsicht der Arbeit, sowie das Korreferat

Herrn Dr. E. Hauser, Sektionschef Bundesamt für Veterinärwesen, Bern, Sektion Lebensmittelchemie, für die Unterstützung bei den Laborarbeiten

Herrn H.J. Heiz für die Einführung in die Gaschromatographie

Herrn Dr. G. Hunyady, Sektionschef Bundesamt für Veterinärwesen, Bern, Sektion Fleischbakteriologie, für das Zurverfügungstellen des Arbeitsplatzes sowie für die liebenswerte Aufnahme in seinem Laboratorium und seine wertvollen Ratschläge

Fräulein E. Lüthy und Fräulein Ch. Schwarz, Laborantinnen, Bundesamt für Veterinärwesen, Bern

Herrn Dr. A.G. Rauws, National Institute of Public Health, Bilt-hoven, für die Ratschläge und die freundlichen Auskünfte

die Firmen Cilag AG (Janssen), Schaffhausen, und Provet AG (Bayer), Lyssach, für die Ueberlassung von Reinsubstanzen

Firma Hoffmann-La Roche, Basel, für die Beratung, sowie für die Ueberlassung von Reinsubstanzen

Herrn Dr. E. Eggenberger für die Beratung bei der Auswertung der Resultate

Herrn Dr. R. Hobi für die Kontrolle der Resultate und für die Beratung

Frau Alice Egger für die Schreibarbeiten

Herrn Dr. Horak, Riotton SA., Genf, für die Durchführung der RIA-Untersuchungen

meine Eltern

8. LEBENS LAUF

Als jüngstes Kind des Ernst Flückiger, prakt. Arzt in Rüschlikon, und seiner Frau Gertrud, geb. Arbenz, wurde ich am 24. Juli 1951 in Zürich geboren.

Nach dem Besuch der Primar- und Sekundarschule in Rüschlikon besuchte ich die Stiftung Mittelschule Dr. Buchmann in Zürich, die ich 1971 mit der Eidgenössischen Matura, Typus B, abschloss.

Im Herbst des gleichen Jahres immatrikulierte ich mich an der Universität Zürich. Mein Studium als Tierarzt schloss ich 1977 mit dem Staatsexamen ab.

Vom Mai 1978 bis im Januar 1979 war ich als Assistent in der Kleintierklinik von Herrn Dr. R. Mühlebach, Oftringen, tätig.

Vom März 1979 bis im April 1980 durfte ich als Volontär in den Laboratorien des Bundesamtes für Veterinärwesen in Bern arbeiten.

Vom 1. Mai bis 31. November 1980 war ich Assistent in der Praxis von Herrn Dr. J.B. Fritsche in Appenzell.

Ab 1. April 1981 führe ich eine eigene Tierarztpraxis in Wädenswil.

9. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

9.1. Tabellen

Tabelle 1 - Verschiedene, für die Veterinärmedizin geeignete Psychopharmaka (nach Hapke, 1976). In Klammern sind registrierte Handelsnamen angegeben.

- | | |
|--------------------|--|
| 1. Hypnotika | Barbiturate (Barbital, Phenobarbital, Veta-
narcol, Thiogenal, Surital etc.)
Chloralhydrat
Methomidat (Hypnodil)
Methaqualon |
| 2. Neuroleptika | Azaperon (Stresnil)
Propionylpromazin (Combelen)
Acepromazin (Vetranquil, Plegicil)
Chlorpromazin (Megaphen, Largactil)
Reserpin |
| 3. Ataraktika | Meprobamat (Aneural, Miltaun)
Chlordiazepoxid (Librium)
Diazepam (Valium)
Oxazepam (Adumbran)
Nitrazepam (Mogadon) |
| 4. Andere Sedativa | Hydroxyzin (Atarax)
Xylazin (Rompun)
Thiambuten
Bromide
Chlorbutanol (Chloreton)
Paraldehyd
Tribromäthanol, Trichloräthanol
Urethan
Sulfanol, Trional, Tetronal
Bulbocapnin
Gluthetimid (Doriden)
Methylpentinol
Valanid
Carbromal
Thalidomid
Banactyzin
Magnesiumjonen
Guyfenesin (Myolaxin) |

Tabelle 2 - Dosis-Wirkungsbeziehungen des Azaperons beim Schwein
(nach Marsboom, 1969)

<u>Dosis</u>	<u>Wirkung</u>	<u>Indikation</u>
0,5 mg/kg	schwache Sedation, Schweine legen sich nieder	Exzitationen, Ruhe- losigkeit, Herz- schwäche, Muskel- dystrophie
2,5 mg/kg	Sedationsgrad optimal 4 - 2 h nach Injektion, Dauer ca. 6 - 8 h	
1-2 mg/kg	Optimale Resultate	Geburtsschwierigkeiten
1,5-3 mg/kg		Verhindern des Kämp- fens beim Umgruppieren
5 mg/kg	tiefe Sedation, Salivation, Atemfrequenz erniedrigt, Temperaturabfall um 1-2 Grad ca. 2-3 h nach Applikation	
10 mg/kg	verstärkte Ataxie, Abliegen	
20 mg/kg	Ataxie, leichte paradoxe Reaktionen: Allotriophagie während der Aufwachzeit	
40 mg/kg	hochgradige Ataxie, Saliva- tion, Atemfrequenz erhöht und unregelmässig, Herzfre- quenz normal, Rektaltempera- tur um 2,5°C herabgesetzt, während der Aufwachzeit para- doxe Reaktionen, keine Todes- fälle	

Tabelle 3 - Akute Toxizität des Azaperons (LD₅₀-Werte) bei
verschiedenen Tierarten (Marsboom, 1970)

<u>Spezies</u>	<u>Anwendungsart</u>		
	<u>i.v.</u>	<u>s.c.</u>	<u>oral</u>
Maus	52 mg/kg	179 mg/kg	
Ratte	25 mg/kg	>320 mg/kg	
Hund			> 20 mg/kg
Kaninchen			>160 mg/kg
Pferd	>10 mg/kg	>40 mg/kg	
Schwein		>40 mg/kg	

Tabelle 4 - Resorbtion und Verteilung des Azaperons in den verschiedenen Geweben von Schweinen
(nach Heykants et al., 1971)

Organ bzw. Gewebe	% des Gesamt- gewichtes	% der verabreichten Dosis, gefunden in Organ oder Gewebe					
		nach 4 h		nach 8 h		nach 16 h	
		Azaperon+ Metaboliten	Azaperon	Azaperon+ Metaboliten	Azaperon	Azaperon+ Metaboliten	
Blut	7,5	0,943	0,026	0,646	0,017	0,067	0,002
Gehirn	0,1	0,011	0,001	0,009	0,001	0,003	-
Dünndarm	1,9	0,319	0,034	0,224	0,038	0,070	-
Dickdarm	1,7	0,243	0,036	0,283	0,029	0,081	-
Aeusseres Fettgewebe	0,9	0,254	0,053	0,105	0,036	0,061	-
Herz	0,3	0,026	0,000	0,017	-	0,004	-
Lunge	1,1	0,595	0,037	0,339	0,029	0,122	0,014
Niere	0,4	0,594	0,016	0,252	0,010	0,044	0,002
Muskulatur	40,0	2,760	0,600	1,600	-	0,160	-
Leber	1,9	1,659	0,080	1,752	0,110	0,566	0,070

Tabelle 5 - Konzentrationen von Azaperon und Azaperol im Gewebe von Schweinen 15 min, resp. 1 h nach Injektion von 0,4 mg/kg Azaperon (nach Rauws und Olling, 1978)

	Azaperon (µg/g)		Azaperol (µg/g)	
	15 min	1 h	15 min	1 h
Nieren	0,24 0,15	0,05 0,08	0,77 0,33	0,32 0,28
Leber	0,03 0,03	0,03 0,03	0,18 0,24	0,16 0,17
Hirn	0,04 <0,02	0,02 0,02	0,19 0,14	0,14 0,11
Muskel	0,02 <0,02	<0,02 <0,02	0,03 0,02	0,03 0,04

Tabelle 6 - Schweineversuch: Gewicht der Versuchstiere, verabreichte Azaperondosis und Zeitspanne zwischen Injektion und Schlachtung (eigene Versuche)

Schwein Nr.	Gewicht kg	errechnete Dosis Stresnil ^R in ml (1 ml=40 mg Azaperon)	Betrieb	Zeitspanne Injektion / Schlachtung
<u>Gruppe 1: 0,4 mg/kg</u>				
1	96	0,96	B	1 h 05 min
2	118	1,18	B	1 h 10 min
3	115	1,15	B	2 h 05 min
4	115	1,15	B	1 h 50 min
5	108	1,08	A	3 h 55 min
6	103	1,03	A	3 h
7	103	1,03	A	9 h 05 min
8	103	1,03	A	7 h 50 min
9	97	0,97	A	22 h 35 min
10	125	1,25	A	22 h 30 min
15	112	1,12	B	4 h 05 min
<u>Gruppe 2: 1,0 mg/kg</u>				
11	96	2,4	B	2 h 05 min
12	101	2,5	A	4 h 05 min
13	125	3,1	A	8 h 15 min
14	106	2,65	A	46 h 55 min

Tabelle 7 - Einwaagen für die Bestimmung der Ausbeute (Recovery)

Extraktion Nr.	µg Azaperon / 10,0 g Nierenhomogenat	µg Azaperol / 10,0 g Nierenhomogenat
Leerwert	-	-
Leerwert	-	-
1	0,35	0,29
2	0,35	0,29
3	0,70	0,59
4	0,70	0,59
5	1,77	1,48
6	1,77	1,48
7	3,54	2,97
8	3,54	2,97
9	7,08	5,98
10	7,08	5,98
11	10,77	14,87
12	10,77	14,87
13	35,40	29,74
14	35,40	29,74

Tabelle 8 - Ausbeuten aus Nierenhomogenaten

Nr. der Recovery- Extraktion	Einwaage µg/10 g Nierenh.	HPLC µg/10 g Nierenh.	%	GC KAP µg/10 g Nierenh.	%	GC GGS µg/10 g Nierenh.	%	Dünnschicht + = Azaperon nachweisbar
<u>Azaperon</u>								
Leerwert	-	-	-	-	-	0,44	-	+
Leerwert	-	-	-	-	-	0,29	-	+
1	0,35	0,26	73	-	-	0,24	68	+
2	0,35	0,53	151	-	-	0,38	109	+
3	0,70	1,03	146	0,59	83	0,72	102	+
4	0,70	0,57	81	0,34	49	0,73	104	+
5	1,77	1,52	86	1,50	84	1,66	94	+
6	1,77	1,13	64	1,09	61	1,12	63	+
7	3,54	2,71	76	2,62	74	2,79	79	+
8	3,54	2,74	77	2,94	83	2,46	69	+
9	7,08	4,17	59	5,53	78	4,31	60	+
10	7,08	4,44	62	6,09	86	4,77	67	+
11	10,77	9,14	84	8,67	80	9,42	87	+
12	10,77	5,04	46	4,56	42	4,97	46	+
13	35,4	12,76	36	12,61	35	14,30	40	+
14	35,4	15,05	42	18,45	52	17,01	48	+
Durchschnitt			77 %		67 %		74 %	
einfache								
Standardabweichung			± 35 %		± 19 %		± 23 %	
<u>Azaperol</u>								
Leerwert	-	-	-			0,82	-	+
Leerwert	-	-	-			0,38	-	+
1	0,29	0,201	67			0,24	81	+
2	0,29	0,42	143			0,29	100	+
3	0,59	0,49	83			0,32	53	+
4	0,59	0,38	64			0,41	68	+
5	1,48	0,62	42			0,80	54	+
6	1,48	0,46	30			0,48	32	-
7	2,97	1,29	43			0,63	21	+
8	2,97	1,80	60			1,11	37	+
9	5,98	0,94	15			0,59	10	+
10	5,98	2,85	47			2,43	40	+
11	14,87	6,05	40	5,86	39	3,51	23	+
12	14,87	3,51	23	3,95	27	2,64	17	+
13	29,74	12,52	42	13,3	45	12,18	40	+
14	29,74	-	-	12,16	41	9,35	31	+
Durchschnitt			54 %				44 %	
einfache								
Standardabweichung			± 34 %				± 27 %	
Nachweisgrenzen		HPLC 0,1 ng		GC KAP 8 ng		GC GGS 2 ng		DC 20 ng Azaperon 40 ng Azaperol

Tabelle 9 - Abhängigkeit der Azaperonkonzentrationen
in Schweinenieren von der Zeit nach der Injektion

Nr. (L=linke R=rechte Niere)	Zeitspanne Injektion / Schlachtung	HPLC (µg/g Nierenhomogenat)	GC KAP	GC GGS	Dünnschicht + =Azaperon nachweisbar
<u>Gruppe 1:</u> Applizierte Azaperonmenge 0,4 mg/kg KG					
1L	1 h 05 min	0,1167	0,1119	0,0616	+
1R	1 h 05 min	0,0795	0,1522	0,0470	+
2L	1 h 10 min	0,0675	0,0644	0,0819	+
2R	1 h 10 min	0,0616	0,0660	0,0681	+
3L	2 h 05 min	0,0820	0,0639	0,0727	+
3R	2 h 05 min	0,0718	0,0646	0,0434	+
4L	1 h 50 min	0,0866	0,0692	0,0964	+
4R	1 h 50 min	0,0740	0,0758	0,0850	+
5L	3 h 55 min	0,0226	0,0438	0,0775	+
5R	3 h 55 min	0,0226	0,0387	0,0541	+
6L	3 h	0,0420	0,1014	0,1035	+
6R	3 h	0,0430	0,0482	0,0605	+
7L	9 h 05 min	0,0377	0,0340	0,0789	+
7R	9 h 05 min	0,0354	0,0497	0,0409	+
8L	7 h 50 min	1,1989	1,7575	2,9426	verunreinigt
8R	7 h 50 min	1,1900	1,8649	0,0202	+
9L	22 h 35 min	0,3491	0,4512	0,3089	+
9R	22 h 35 min	0,2984	0,3936	0,0755	+
10L	22 h 30 min	0,0648	0,0564	0,0786	+
10R	22 h 30 min	0,0613	0,0465	0,1516	+
15L	4 h 05 min	0,0699	0,0987	0,1013	+
15R	4 h 05 min	0,0412	0,0599	0,0739	+
<u>Gruppe 2:</u> Applizierte Azaperonmenge 1 mg/kg KG					
11L	2 h 05 min	0,2574	0,3077	0,2089	+
11R	2 h 05 min	1,1163	0,9185	1,4940	+
12L	4 h 05 min	0,1127	0,1172	0,0898	+
12R	4 h 05 min	0,1420	0,1641	0,1367	+
13L	8 h 15 min	0,0642	0,0617	0,0715	+
13R	8 h 15 min	0,0993	0,0866	0,0895	+
14L	46 h 55 min	0,0309	0,0266	0,0343	+
14R	46 h 55 min	0,0377	0,0332	0,0488	+
Nachweisgrenzen		HPLC 0,1 ng	GC KAP 8 ng	GC GGS 2 ng	DC 20 ng

Tabelle 10 - Abhängigkeit der Azaperolkonzentrationen
in Schweinenieren von der Zeit nach der Injektion

Nr. (L=linke R=rechte Niere)	Zeitspanne Injektion / Schlachtung	HPLC (pg/g Nierenhomogenat)	GC KAP	GC GGS	Dünnschicht + =Azaperol nachweisbar
<u>Gruppe 1:</u> Applizierte Azaperonmenge 0,4 mg/kg KG					
1L	1 h 05 min	0,1430	0,1439	0,0302	+
1R	1 h 05 min	0,0936	0,0928	0,0415	+
2L	1 h 10 min	0,0374	0,0330	0,0542	-
2R	1 h 10 min	0,0378	0,0225	0,0526	+
3L	2 h 05 min	0,0742	0,0546	0,0733	+
3R	2 h 05 min	0,0584	0,0728	0,0368	+
4L	1 h 50 min	0,0380	0,0256	0,0773	-
4R	1 h 50 min	0,0286	0,0426	0,0576	+
5L	3 h 55 min	0,0167	0,0551	0,0862	-
5R	3 h 55 min	0,0172	-	0,0489	+
6L	3 h	0,0835	0,1169	0,1526	+
6R	3 h	0,0882	0,1198	0,0372	+
7L	9 h 05 min	0,0331	0,0504	0,0722	+
7R	9 h 05 min	0,0358	0,0524	0,0536	+
8L	7 h 50 min	4,8076	>1,3181	90,7186	verunreinigt
8R	7 h 50 min	4,7289	-	0,0516	+
9L	22 h 35 min	0,2181	0,164	0,0954	+
9R	22 h 35 min	0,1606	0,0672	0,1462	+
10L	22 h 30 min	0,1110	0,1614	0,1190	-
10R	22 h 30 min	0,0763	0,0817	0,2854	+
15R	4 h 05 min	0,0587	0,1546	0,1198	+
15L	4 h 05 min	0,0396	0,1275	0,0933	+
<u>Gruppe 2:</u> Applizierte Azaperonmenge 1 mg/kg KG					
11L	2 h 05 min	0,3562	0,5171	0,3074	+
11R	2 h 05 min	1,2447	0,9884	1,4441	+
12L	4 h 05 min	0,1845	0,2490	0,1423	+
12R	4 h 05 min	0,2228	0,3314	0,2203	+
13L	8 h 15 min	0,0984	0,1383	0,1060	+
13R	8 h 15 min	0,0557	0,0665	0,0638	+
14L	46 h 55 min	0,0238	-	0,0267	+
14R	46 h 55 min	0,0120	-	0,0267	-
Nachweisgrenzen		HPLC 0,1 ng	GC KAP 8 ng	GC GGS 2 ng	DC 40 ng

Tabelle 11 - Gegenüberstellung der Nachweisgrenzen mit HPLC, GC gepackt, GC Kapillare und Dünnschichtchromatographie

Nachweisverfahren	minimal nachweisbare Konzentrationen (absolut) mit Reinsubstanz	
	Azaperon	Azaperol
HPLC	0,1 ng	0,1 ng
GC mit gepackter OV-17 Glassäule (Alkali-FID)	2 ng	2 ng
GC mit OV-17 Glas- kapillarsäule (FID)	8 ng	8 ng
Dünnschichtchromatographie	20 ng	40 ng

9.2. Abbildungen

Abbildung 1 - Schema zum Ermitteln von tolerierbaren Höchstmengen von Rückständen in Lebensmitteln (nach Grossklaus, 1973)

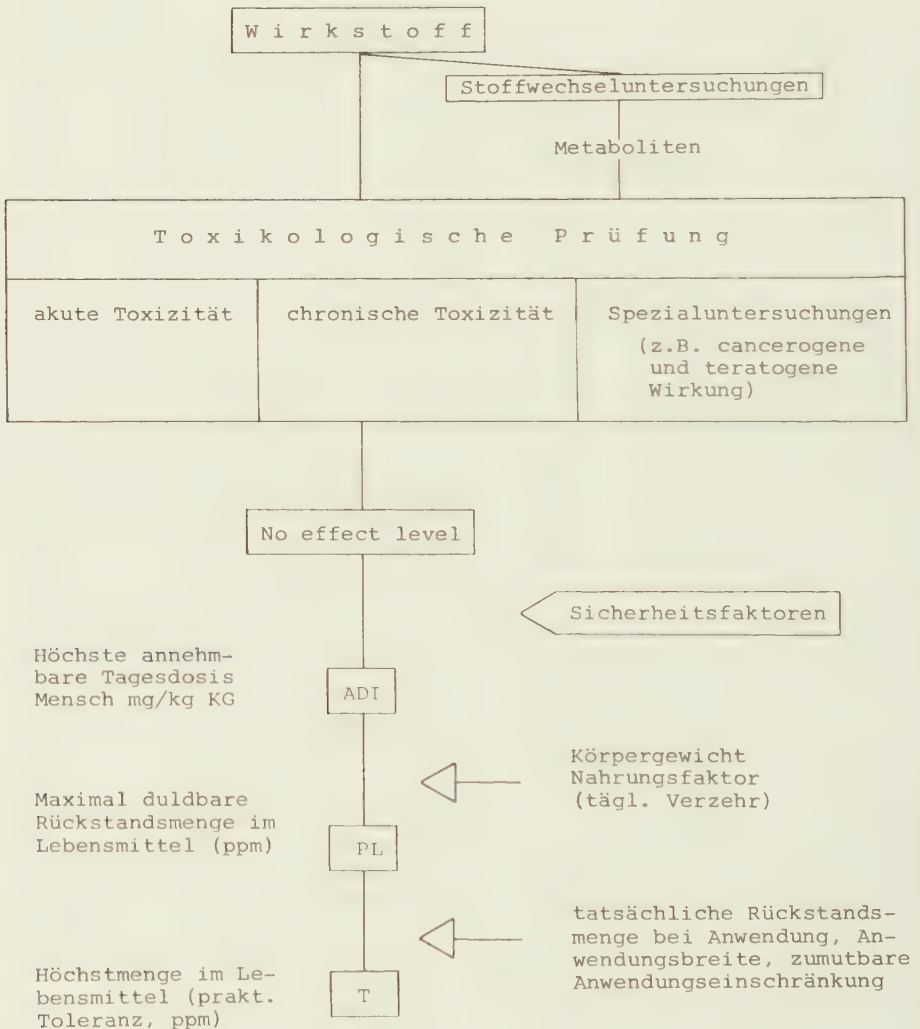


Abbildung 2 - Einfache Uebersicht über die Psychopharmaka
(nach Fischer, Kotter und Kreuzer, 1975)

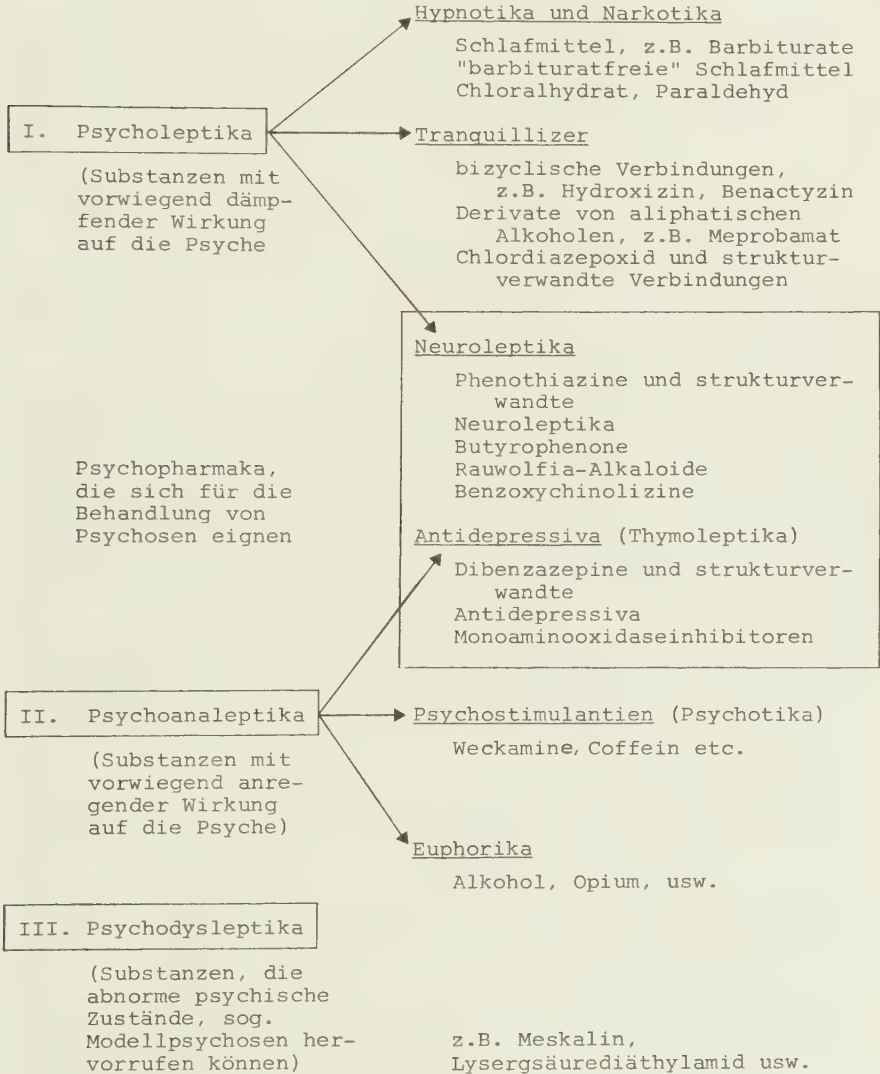
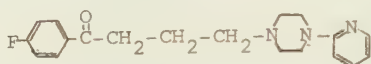


Abbildung 3 - Strukturformel und kurze Charakterisierung des Azaperons (Stresnil^R)



1-(4-Fluorophenyl)-4-[4-(2-pyridinyl)-1-piperazinyl]-1-butanon

Schmelzpunkt: 92 - 93° C (Reinsubstanz) (Rauws et al., 1975)

Summenformel und Molekulargewicht: C₁₉H₂₂FN₃O 327.39

Azaperon ist ein gelblich-weisses, amorphes bis kristallines Pulver und ist, abgesehen von einem leicht aromatischen Geruch, beinahe geschmacklos. Bei Zimmertemperatur ist es in Wasser schwach löslich (0,23 mg/ml), gut löslich in verdünnten organischen Säuren (56 mg/ml in 0,1 M Essigsäure, pH 4,9). Azaperon und seine Lösungen werden durch Licht chemisch verändert.

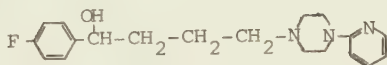
Im Dunkeln bleiben sie über ein Jahr lang stabil. Eine Sterilisation erfolgt, falls notwendig, durch Filtration und anschließenden Zusatz von Bakteriostatika wie Methyl- und Propylparaben (Niemegeers, Van Nueten und Janssen, 1974).

Die Handelslösung (Stresnil^R) enthält als Lösungsmittel Weinsäure. Azaperon hat in methanolischer Lösung im UV-Licht ein Absorptionsmaximum bei 248 nm.

Azaperon reagiert mit Dragendorff'schem Reagens positiv (Rotfärbung).

Massenspektrogramme geben Frigerio und Rovere (1972) und Rauws et al. (1976) an.

Abbildung 4 - Strukturformel und kurze Charakterisierung des Azaperols



1-(4-Fluorophenyl)-4 [4-(2-pyridinyl)-1-piperazinyl] -1-butanol

Schmelzpunkt: 103,5 - 104,5° C

Summenformel und Molekulargewicht: C₁₉H₂₃FN₃O 328.39

Azaperol lässt sich durch Reduktion von Azaperon mit Natriumborhydrid herstellen. Seine Polarität ist etwas grösser als jene von Azaperon. Auch Azaperol reagiert mit Dragendorff'schem Reagens positiv. Absorptionsmaximum in methanolischer Lösung bei 248 nm.

Ein Massenspektrogramm wird von Rauws et al. (1976) angegeben.
(m/e : 329)

Abbildung 5 - Plasmaspiegel der Totalradioaktivität (T.R.) und von unverändertem Azaperon (U.A.) in $\mu\text{g/ml}$ im Plasma nach intramuskulärer Gabe von 1 mg/kg KG 3-H-Azaperon (nach Heykants und Marsboom, 1971)

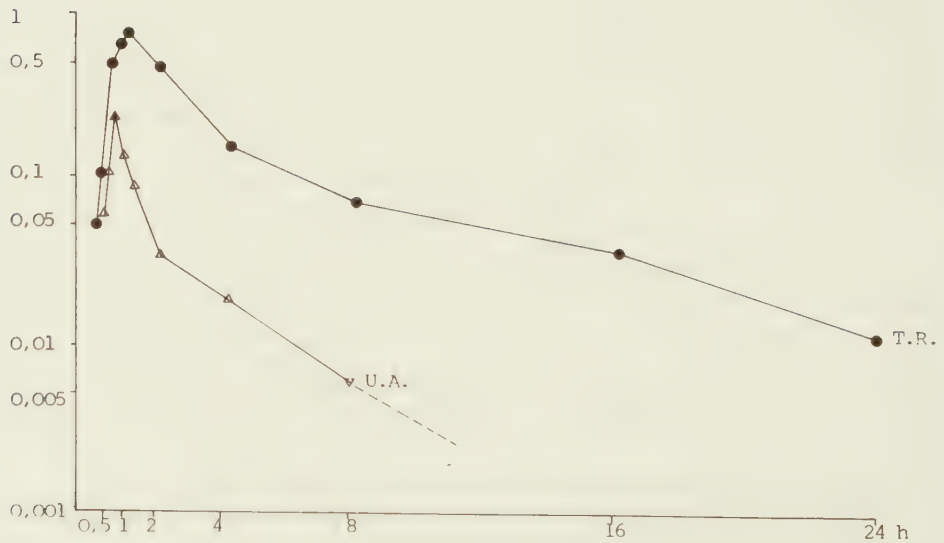


Abbildung 6 - Absolute Prozentsätze von Azaperon und verschiedenen Metaboliten in den Exkreten der Ratte. Dosis 1 mg/kg (Heykants, Pardoel und Janssen, 1971)

	Pharma- kodynamik
Prozentueller Anteil der Dosis im Urin und Faeces 0-8 h 8-24 h 24-48 h 0-24 h 24-48 h 1,1 0,4 0,0 7,6 4,0 -	
Azaperone: 4'-fluoro-4-[4-(2-pyridyl)-1-piperazinyl] butyrophene Oxydative N-Dearylation 4'-fluoro-4-(1-piperazinyl)-butyrophenon 0,5 0,2 0,1 16,8 4,4 inaktiv	
Azetylierung 4-(4-azetyl)-1-piperazinyl-4'-fluorobutyrophene 3,4 2,0 0,5 15,4 3,5 schwache neuroleptische Wirkung	
β-(p-fluorobenzoyl)-propionsäure β-Oxydation p-Fluorophenyl-essigsäure 0,2 0,1 0,0 1,6 0,6 inaktiv	
Glycin p-Fluorophenazetur-säure 0,7 0,2 0,0 2,5 1,6 inaktiv	
3,1 0,6 0,1 2,5 0,9 inaktiv	

Abbildung 7 - Fliessdiagramm der Aufarbeitung (Rauws et al., 1976)

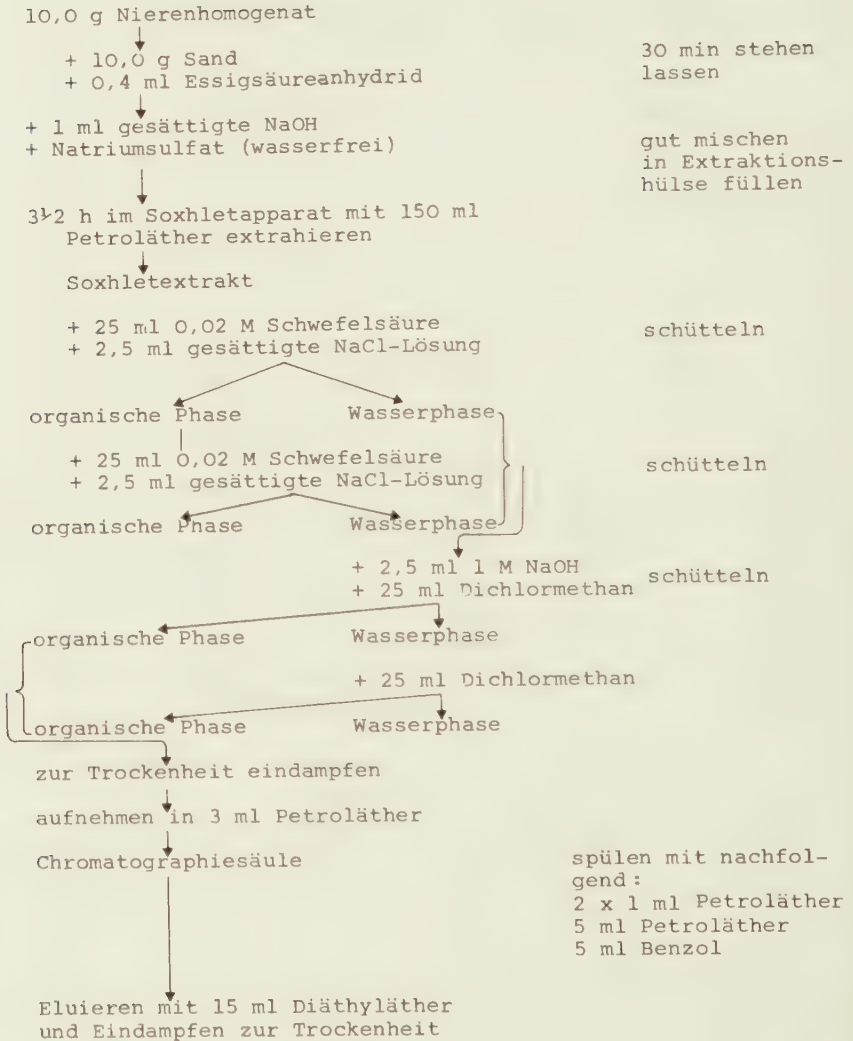


Abbildung 8 - Abhängigkeit der Azaperon- und Azaperolkonzentrationen in Schweinenieren von der Zeit nach der Injektion. Dosis 0,4 mg/kg KG, Versuchsgruppe 1 (Nr. 1-10 und 15)
(Graphische Darstellung der Werte aus Tabellen 9 und 10)

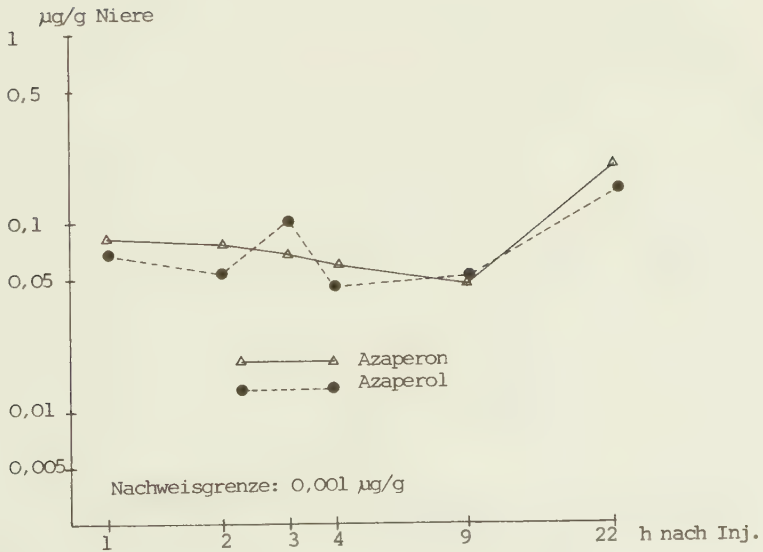


Abbildung 9 - Abhängigkeit der Azaperon- und Azaperolkonzentrationen in Schweinenieren von der Zeit nach der Injektion. Dosis 1 mg/kg KG Azaperon, Tiere der Versuchsgruppe 2 (Nrn. 11,12,13,14)
(Graphische Darstellung der Werte aus Tabellen 9 und 10)

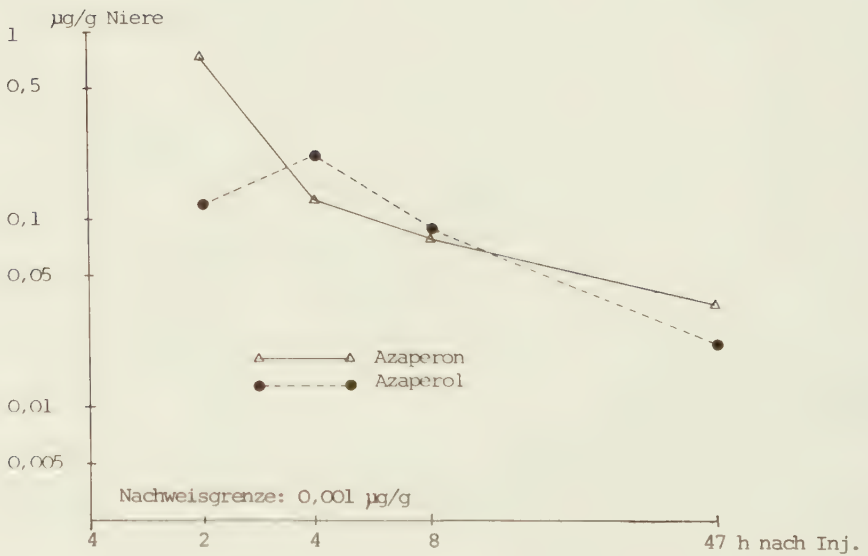
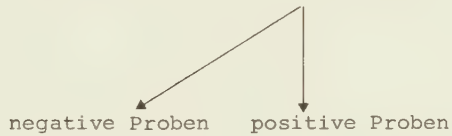


Abbildung 10 - Vorschlag für ein System zur Ueberwachung des
Fleischmarktes auf Azaperonrückstände

Screening-Methoden:

immunchemische Methoden
(noch zu entwickeln)

Dünnschichtchromatographie
(ev. aus Harnproben)



Methode zur Bestätigung:

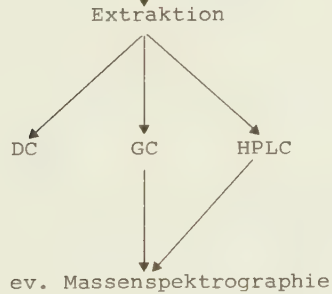


Abbildung 11 - Eichkurve, Regressionsgerade und Vertrauensbereich (obere 1 % Schranke der F-Verteilung) für die HPLC-Analyse für Azaperon

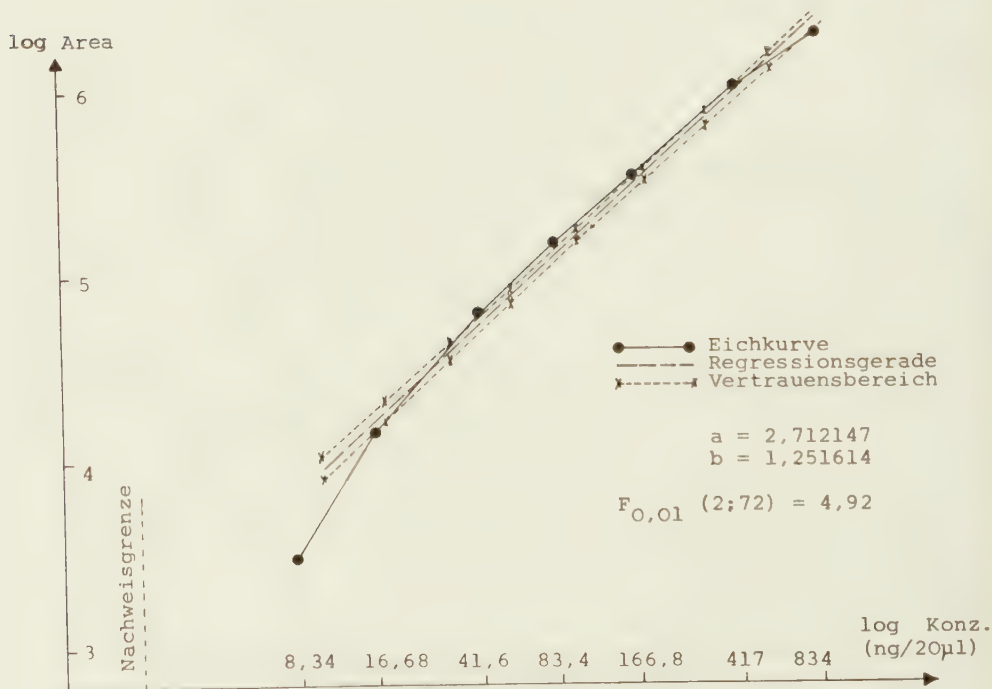


Abbildung 12 - Eichkurve, Regressionsgerade und Vertrauensbereich (obere 1 % Schranke der F-Verteilung) für die HPLC-Analyse für Azaperol

log Area

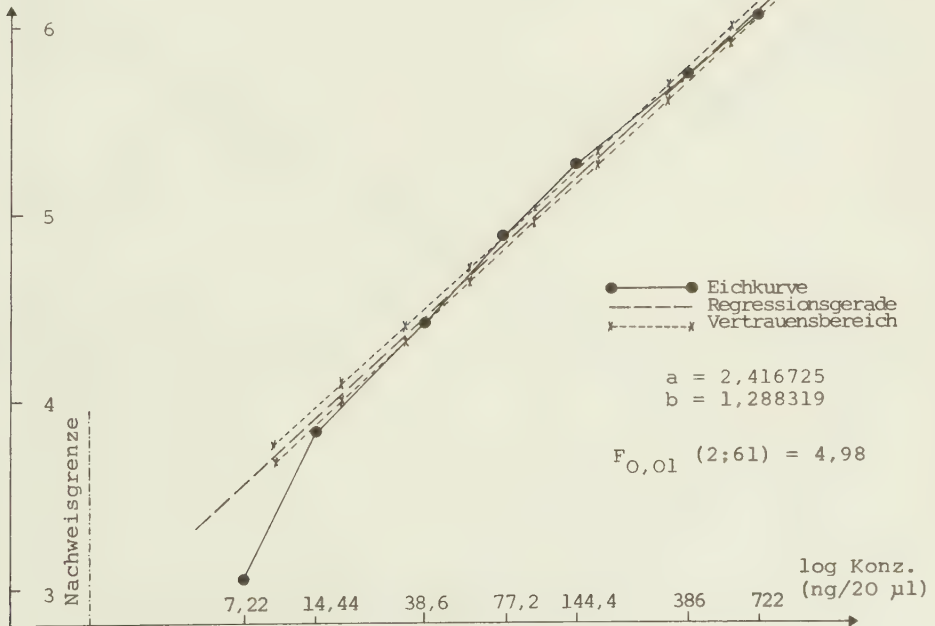


Abbildung 13 - Eichkurve, Regressionsgerade und Vertrauensbereich (obere 1 % Schranke der F-Verteilung) für die GC-Analyse mit gepackter Säule für Azaperon

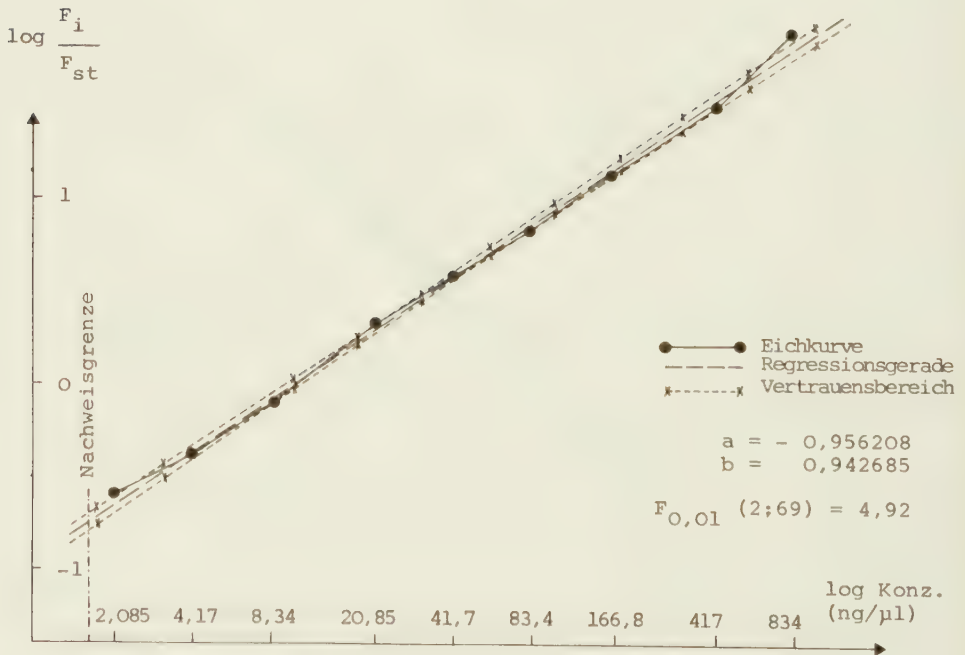


Abbildung 14 - Eichkurve, Regressionsgerade und Vertrauensbereich
(obere 1 % Schranke der F-Verteilung) für die
GC-Analyse mit gepackter Säule für Azaperol

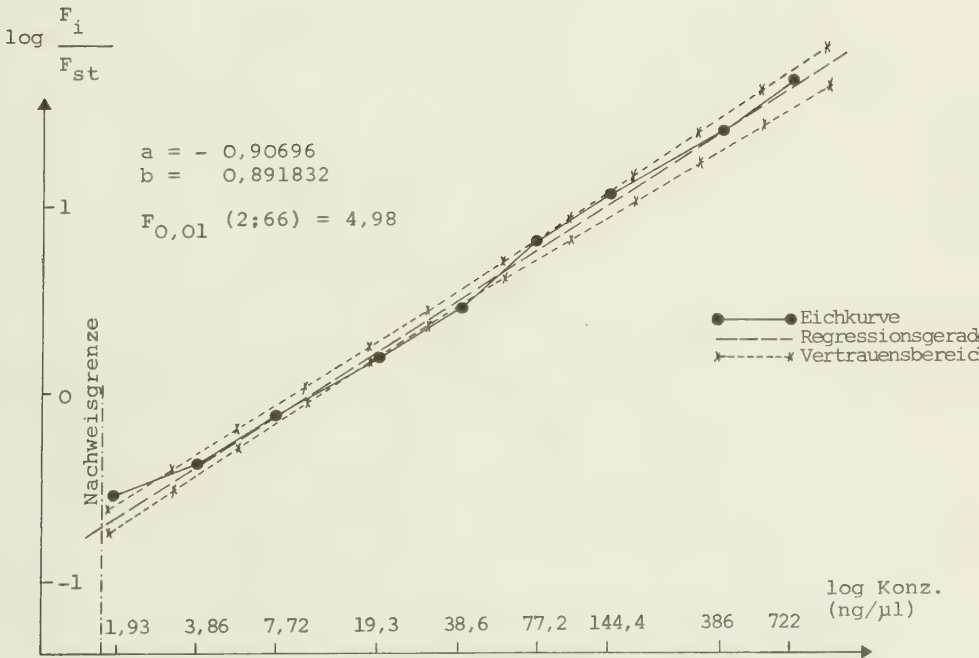


Abbildung 15 - Eichkurve, Regressionsgerade und Vertrauensbereich (obere 1 % Schranke der F-Verteilung) für die GC-Analyse mit Glaskapillare für Azaperon

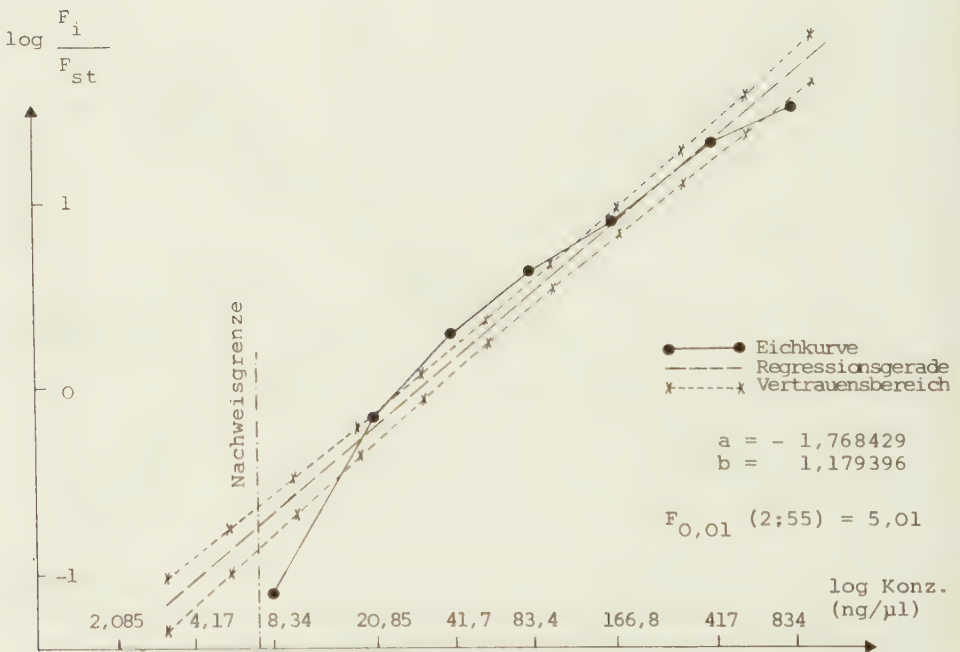


Abbildung 16 - Eichkurve, Regressionsgerade und Vertrauensbereich (obere 1 % Schranke der F-Verteilung) für die GC-Analyse mit Glaskapillare für Azaperol

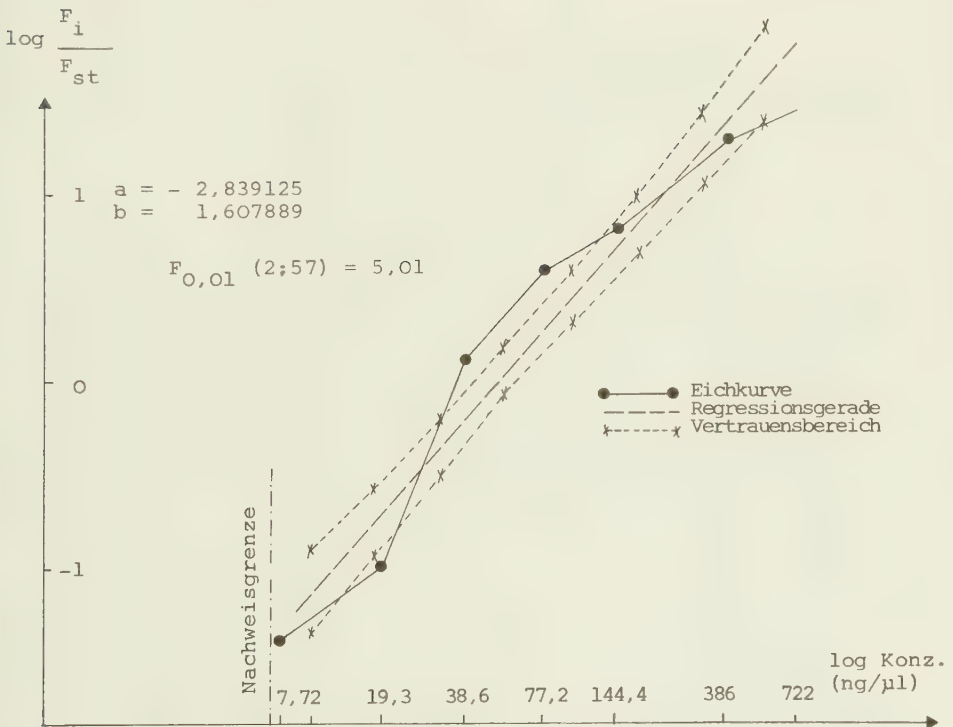


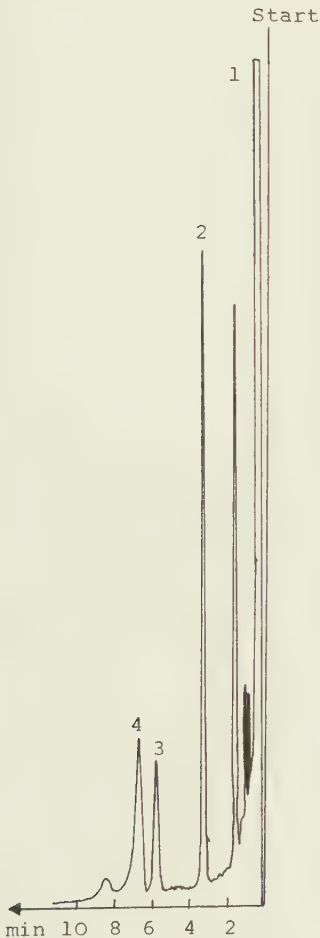
Abbildung 17 - Gaschromatographische Trennung von Diazepam, Azaperon und Azaperol mit gepackter Glassäule (Rein-
substanzen)



1 Diazepam 30 ng
2 Azaperon 160 ng
3 Azaperol 160 ng

Glassäule i.D. 3 mm, 1,5 m, 3 %
OV-17 auf Gaschrom Q 100/120 mesh,
isotherm 280° C, Injektorblock
300° C, Trägergas Argon 40 ml/min,
Alkaliflammendetektor, Probenmenge
2 µl. Abschwächung: 1 x 160
Schreiber: 1 mV, 0,5 cm/min

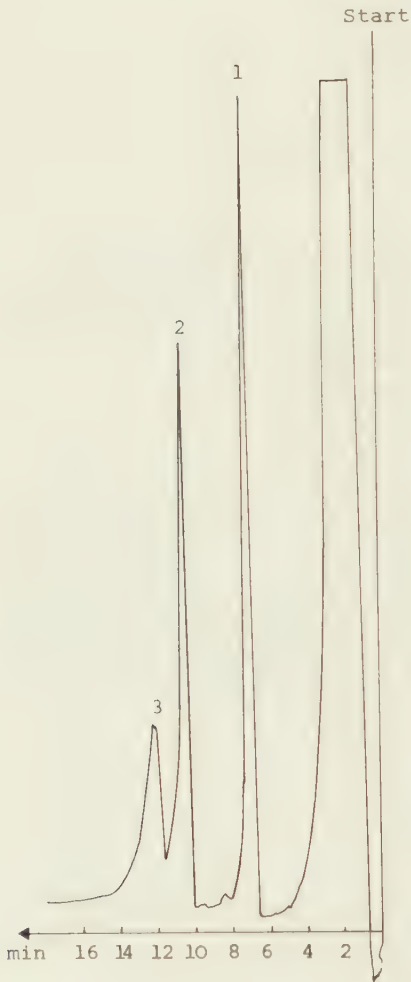
Abbildung 18 - Gaschromatogramm mit gepackter Säule vom Extrakt aus der rechten Niere von Schwein Nr. 9, 22 h 35 min nach i.m. Applikation von 0,4 mg/kg Stresnil^R



- 1 Lösungsmittel (Aethylacetat)
- 2 Diazepam (14,5 ng/μl) = interner Standard
- 3 Azaperon
- 4 Azaperol

Gepackte Glassäule i.D. 3 mm, 3 % OV-17 auf Gaschrom Q (100/120 mesh) isotherm 280° C, Injektorblock 300° C, Trägergas: Argon 40 ml/min Alkaliflammendetektor. Abschwächung 8 x 10. Schreiber: 1 mV, 0,5 cm/min. Injektionsvolumen 4 μl

Abbildung 19 - Gaschromatische Trennung von Diazepam, Azaperon und Azaperol mit Glaskapillare OV-17, 23 m, i.D. 0,28 mm (Reinsubstanzen)



1 Diazepam

2 Azaperon

3 Azaperol

Programm: 3 min isotherm bei 240° C,
dann mit 10°/min aufheizen bis
260° C, dann isotherm

Carrier: H₂ 0,7 bar, Detektor: FID

Schreiber: 0,5 cm/min, 1 mV

Abschwächung: 1 x 64, Probenmenge:

1,7 µl in Aethylacetat

Injektoblock: 300° C

Abbildung 20 - Gaschromatographie mit Kapillarsäule vom Extrakt aus der rechten Niere von Schwein Nr. 9, 22 h 35 min nach i.m. Applikation von 0,4 mg/kg KG Stresnil^R



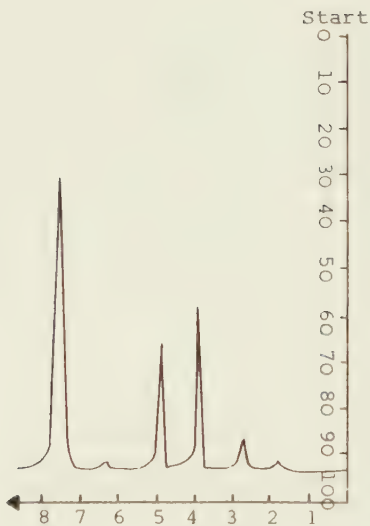
1 interner Standard
(Diazepam 14,5 ng/μl)

2 Azaperon

3 Azaperol

Programm: 3 min isotherm bei
240° C, dann mit 10°/min aufheizen
bis 260° C, dann isotherm
Carrier: H₂, 0,7 bar, Detektor: FID
Schreiber: 0,5 cm/min, 1 mV
Abschwächung: 1 x 32, Proben-
menge: 1,7 μl, in Aethylacetat
Injektorblock: 300° C

Abbildung 21 - Testchromatogramm für die bei der HPLC verwendete
Altex LiChrosorb Si 60 Säule



Pumpe: Altex Modell 110
 Säule: 3,2 x 250 mm LiChrosorb
 Si 60, 5 μ , Lösungsmittel:
 Hex/IPA 970/30, Fluss: 1 ml/min
 bei 300 psi Raumtemperatur
 Detektor: Altex Modell 153 254 mm
 UV, Abschwächung 0,16, Schreiber:
 1 cm/min, Probengrösse: 3 μ l
 Probenzusammensetzung:
 Dimethyl-benzyl-alkohol
 Methyl-benzyl-alkohol
 Cinnamylalkohol

Abbildung 22 - Chromatogramm von Azaperon und Azaperol ohne Zugabe des internen Standards und mit Methanol als Lösungsmittel (HPLC)



Mobile Phase:

Dichlormethan 92 %

Methanol 8 %

1 Methanol

2 Azaperon

3 Azaperol

Altex LiChrosorb Si 60, 5 μ ,

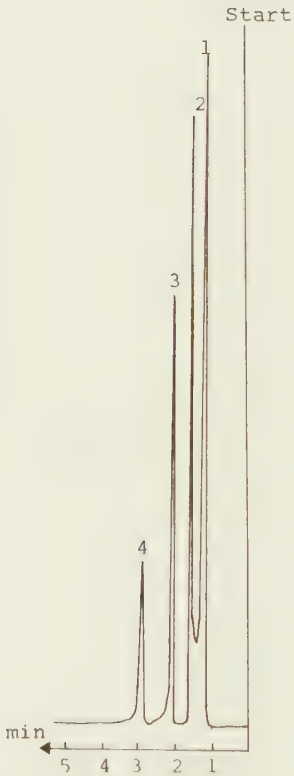
250 x 3,2 mm, 1,5 ml/min,

ca. 1500 psi, Detektor: 248 nm UV,

Range 0.05, Time constant 2

Schreiber: 1 cm/min, 10 mV

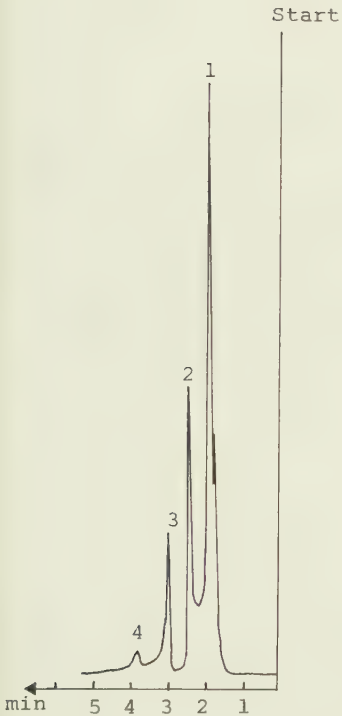
Abbildung 23 - Trennung von Azaperon, Azaperol und Diazepam mit HPLC (Reinsubstanzen)



- 1 Aethylacetat
- 2 Diazepam 500 ng
- 3 Azaperon 500 ng
- 4 Azaperol 500 ng

Altex LiChrosorb Si 60 5 μ 3,2 x
 250 mm, 1,5 ml/min, 1000 psi
 Detektor: 248 nm UV, 0,5
 Schreiber: 1 cm/min, 10 mV
 Lösungsmittel: Dichlormethan/Methanol/Aethylacetat 90/6/4 (V/V/V)
 Probenaufgabe mit 20 μ l-Schleife

Abbildung 24 - HPLC-Chromatogramm von Extrakt aus der rechten Niere von Schwein Nr. 9, 22 h 35 min nach i.m. Applikation von 0,4 mg/kg Azaperon



- 1 Aethylacetat
- 2 Diazepam
- 3 Azaperon
- 4 Azaperol

Altex LiChrosorb Si 60, 5 μ ,
3,2 x 250 mm, 1 ml/min, ca.400 psi

Mobile Phase:

Dichlormethan 90 %

Methanol 6 %

Aethylacetat 4 %

Detektor: 248 nm UV, Range 0.01

Time constant 2, Absorbtion

Schreiber: 1 cm/min, 500 mV

Abbildung 25 - Trennung von Azaperon und Azaperol auf einer
RP C-2 Säule (HPLC)

1 Azaperon

2 Azaperol



Altex LiChrosorb C-2, 5 μ ,

3,2 x 250 mm

Mobile Phase: 2 ml/min (ca. 4500 psi)

Methanol/Wasser 90/10 (V/V)

Detektor: 248 nm UV, Absorbtion 0.01

Schreiber: 20 mV, 1 cm/min

Probenaufgabe mit 20 μ l-Schleife,

Lösungsmittel Methanol

Abbildung 26 - Verlauf der Korrekturfaktoren zwischen Azaperon und Diazepam bei der Gaschromatographie mit gepackter Glassäule (OV-17)

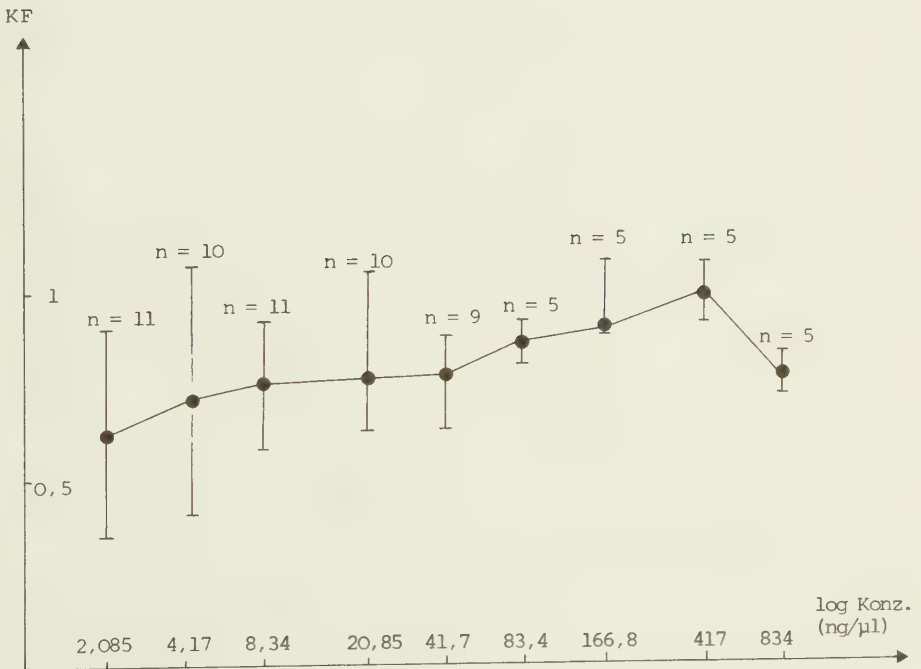


Abbildung 27 - Verlauf der Korrekturfaktoren zwischen Azaperol und Diazepam bei der Gaschromatographie mit gepackter Glassäule (OV-17)

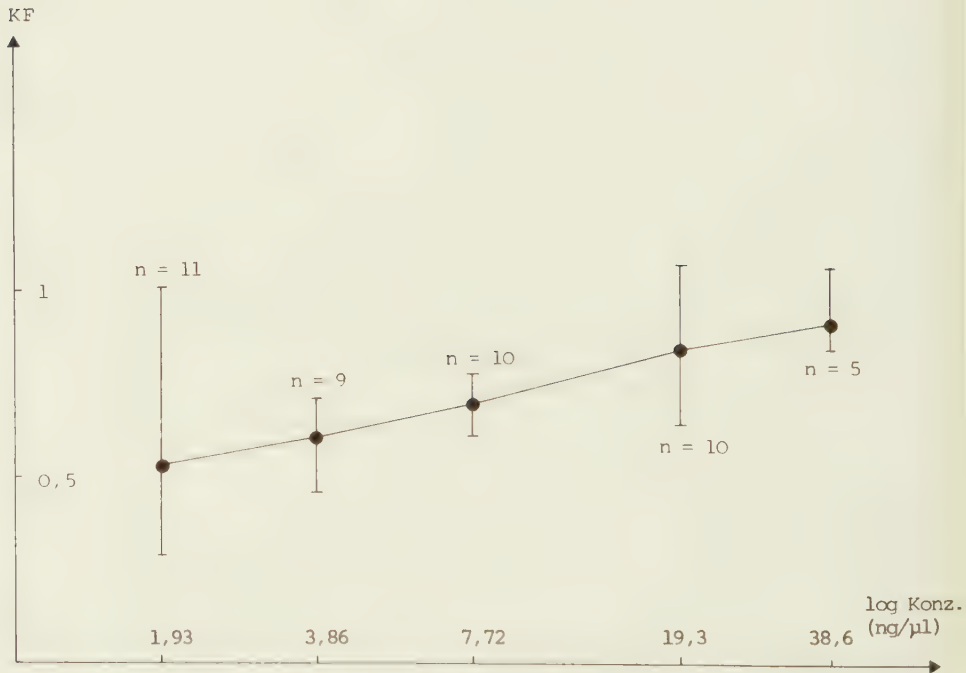


Abbildung 28 - Verlauf der Korrekturfaktoren zwischen Azaperon und Diazepam bei der GC-Analyse mit Kapillare

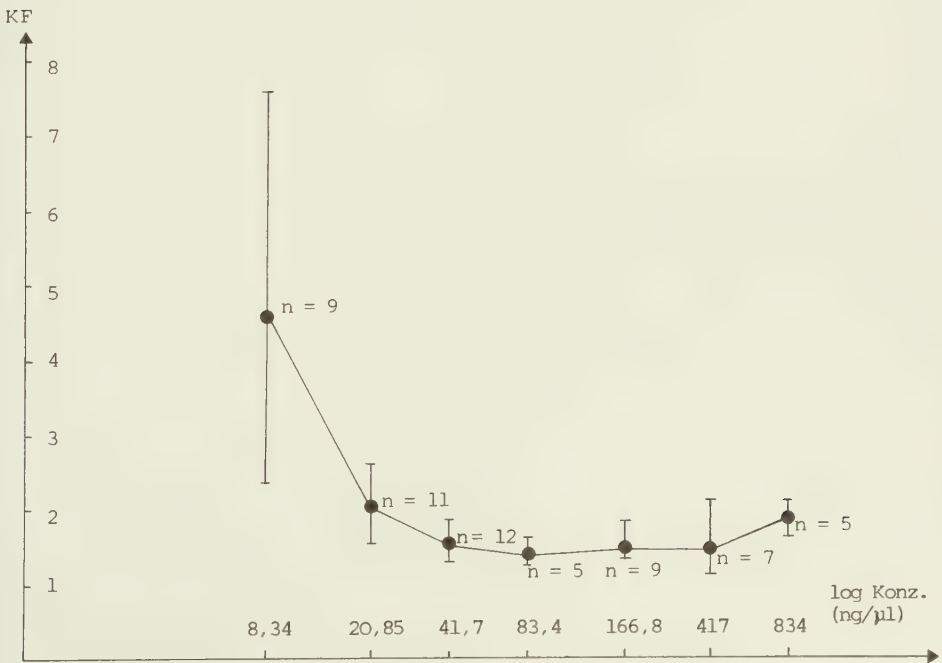


Abbildung 29 - Verlauf der Korrekturfaktoren zwischen Azaperol und Diazepam bei der GC-Analyse mit Kapillare

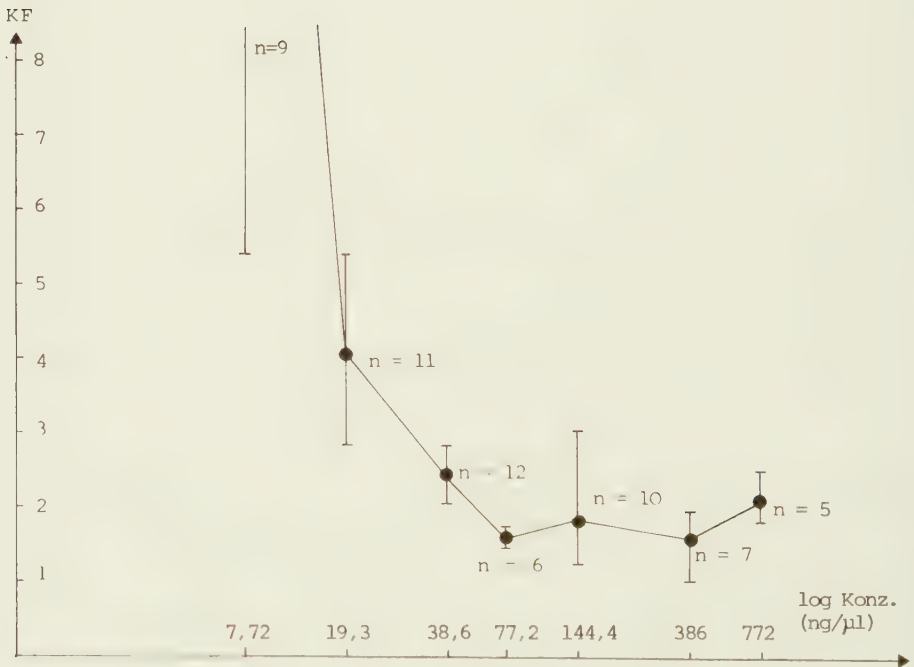
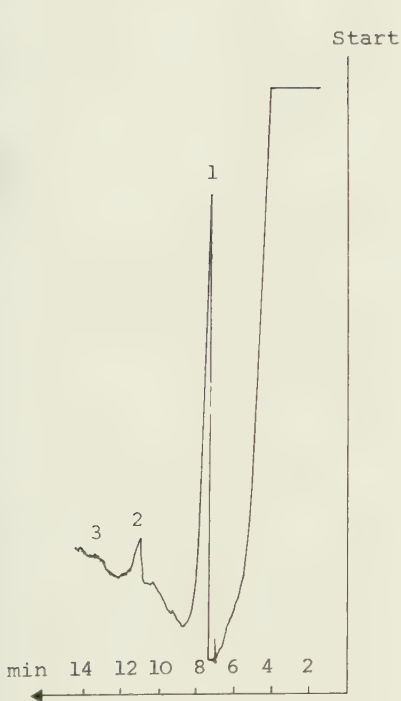


Abbildung 30 - Gaschromatographische Trennung von Diazepam, Azaperon und Azaperol mit Glaskapillare OV-17.
Nachweisgrenze mit Reinsubstanz



- 1 interner Standard
(Diazepam) 14,5 ng/μl
- 2 Azaperon 8 ng/μl
- 3 Azaperol 7 ng/μl

Programm: 3 min isotherm bei 240° C,
dann aufheizen mit 10°/min bis
260° C, dann isotherm. Injektor-
block 300° C. Carrier: H₂, 0,7 bar,
Detektor: FID, Schreiber: 0,5 cm/min,
1 mV, Abschwächung: 1 x 8,
Probenmenge: 1,7 μl in Aethylacetat

Abbildung 31 - Chromatogramm der absoluten Nachweisgrenze mit Reinsubstanz (HPLC)



1 Lösungsmittel (Aethylacetat)

2 0,1 ng Diazepam

3 0,1 ng Azaperon

4 0,1 ng Azaperol

LiChrosorb Si 60 5 μ , 3,2 x 250 mm

1 ml/min, ca. 400 psi

Detektor: 248 nm UV, Range 0.02

Time constant 2

Schreiber: 1 cm/min, 5 mV

Lösungsmittel:

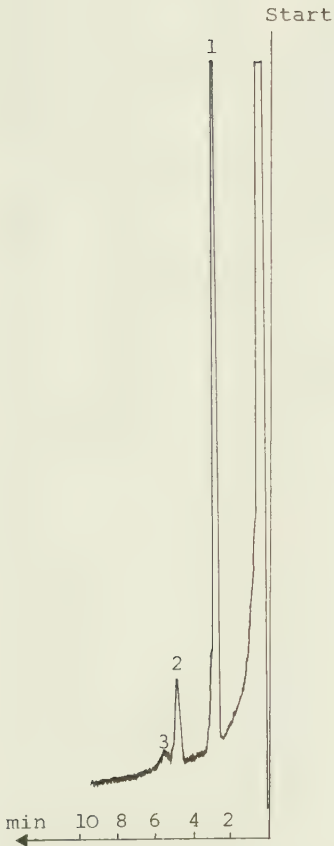
Dichlormethan 90 %

Methanol 6 %

Aethylacetat 4 % (V/V/V)

Probenaufgabe mit 20 μ l Schleife

Abbildung 32 - Gaschromatographische Trennung von Diazepam, Azaperon und Azaperol mit gepackter Glassäule 3 % OV-17. Nachweisgrenze mit Reinsubstanz



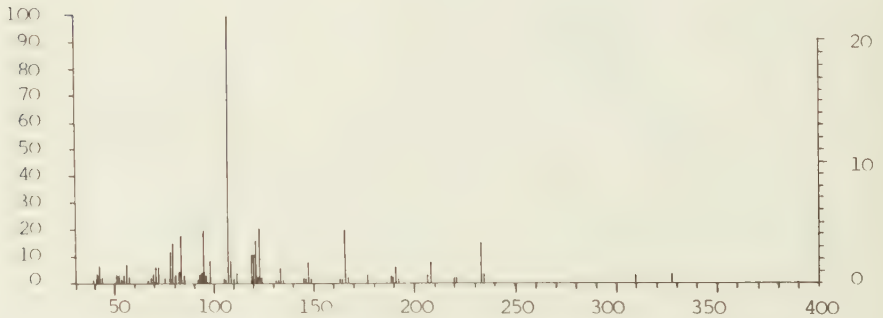
- 1 interner Standard (Diazepam) 14,5 ng
- 2 Azaperon 2 ng
- 3 Azaperol 2 ng

Gepackte Glassäule i.D. 3 mm, 1,5 m
 3 % OV-17 auf Gaschrom Q (100/120
 mesh) isotherm 280° C, Injektor-
 block 300° C, Alkaliflammdetek-
 tor, Carrier: 40 ml/min, Argon,
 Abschwächung: 8 x 2, Schreiber: 1 mV
 0,5 cm/min, Injektionsvolumen: 1 µl

Abbildung 33 - Massenspektrogramm von Azaperon-Reinsubstanz

18/4/80 /SPEC 1163/LM/AZAPERON BASE 27480 SUM 120819

PEAK	I/BASE,C	MASS	PEAK	I/BASE,C	MASS	PEAK	I/BASE,C	MASS
1	1.03%	31.6	37	1.61%	93.1	70	1.41%	161.1
2	1.29%	39.0	38	2.62%	94.1	71	1.11%	162.1
4	3.58%	41.0	39	20.20%	95.1	74	20.27%	165.1
5	6.58%	42.0	40	3.65%	96.1	75	2.14%	166.1
6	1.77%	43.0	42	7.41%	98.1	77	3.20%	176.1
9	2.82%	51.1	45	1.45%	105.1	79	2.28%	189.1
10	2.56%	52.1	46	1.10%	106.1	80	5.21%	190.1
11	1.50%	53.1	47	100.00%	107.1	82	1.30%	204.1
12	1.85%	54.1	48	7.71%	108.1	83	2.07%	206.1
13	3.02%	55.1	49	1.35%	109.1	84	1.46%	207.1
14	7.83%	56.1	50	2.76%	110.1	85	8.60%	208.1
15	2.62%	57.1	53	10.56%	119.1	86	1.16%	209.1
19	1.11%	67.1	54	10.60%	120.1	87	2.41%	220.1
20	1.35%	68.1	55	16.20%	121.1	88	2.95%	221.1
21	2.56%	69.1	56	1.92%	122.1	90	15.39%	233.1
22	5.62%	70.1	57	21.10%	123.0	91	3.47%	234.1
23	5.20%	71.1	58	1.56%	124.0	92	3.74%	309.1
25	2.42%	75.1	61	6.22%	133.1	95	3.27%	327.1
28	11.90%	78.1	62	1.38%	134.1			
29	15.33%	79.1	63	1.09%	135.1			
30	2.40%	80.1	64	1.35%	138.1			
32	3.71%	82.1	65	1.58%	145.1			
33	18.45%	83.1	67	7.00%	147.1			
34	2.15%	84.1	68	1.59%	148.1			



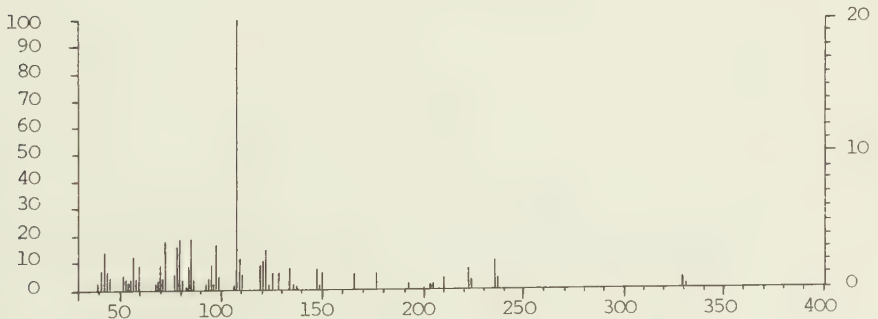
SPEC 1163 IM AZAPERON

A1257 STEP MASS*1, I/B/S,C* 1%

Abbildung 34 - Massenspektrogramm des aus Azaperon synthetisierten
Azaperols

18/4/80 /SPEC 1164/IM/AZAPEROL BASE 31566 SUM 159364

PEAK	I/BASE,C	MASS	PEAK	I/BASE,C	MASS	PEAK	I/BASE,C	MASS
4	2.86%	39.0	36	3.01%	80.1	70	5.08%	123.1
6	7.24%	41.0	39	3.53%	82.1	72	5.05%	125.1
7	15.07%	42.0	40	4.41%	83.1	76	6.44%	133.1
8	7.41%	43.0	41	7.44%	84.1	77	1.77%	134.1
9	4.07%	44.1	42	18.93%	85.2	78	1.52%	135.1
11	1.04%	50.1	43	2.14%	86.2	81	1.07%	145.1
12	4.73%	51.1	46	2.02%	93.1	83	7.55%	147.1
13	3.88%	52.1	47	2.82%	94.1	84	1.55%	148.1
14	1.44%	53.1	48	10.26%	95.1	85	5.08%	149.1
15	2.30%	54.1	49	2.70%	96.1	90	1.93%	164.2
16	3.32%	55.1	50	16.00%	97.1	91	5.97%	165.1
17	12.89%	56.1	51	5.33%	98.1	94	5.65%	176.2
18	4.14%	57.1	52	1.20%	99.1	98	2.68%	192.2
19	7.37%	58.1	56	1.21%	105.1	100	1.39%	204.2
24	1.15%	67.1	57	1.14%	106.1	103	1.06%	207.2
25	1.88%	68.1	58	100.00%	107.1	104	1.03%	208.2
26	2.51%	69.1	59	8.53%	108.1	105	3.86%	210.2
27	7.94%	70.1	60	5.76%	109.1	107	1.81%	220.2
28	4.07%	71.1	62	2.26%	111.2	109	7.86%	222.2
29	17.56%	72.1	63	6.01%	112.2	110	1.38%	223.2
31	1.48%	75.1	66	9.48%	119.1	111	9.30%	235.2
33	4.72%	77.1	67	10.97%	120.1	112	2.34%	236.3
34	16.42%	78.1	68	14.58%	121.1	115	3.57%	329.3
35	18.60%	79.1	69	2.21%	122.1	116	1.33%	330.3



SPEC 1164 IM AZAPEROL

AL258 STEP MASS·1, I/B/S,C· 1 %

Abbildung 35 - RIA: Verlauf der Veränderungskurven beim ersten Versuch mit Reinsubstanz-Lösungen in Methanol/Wasser

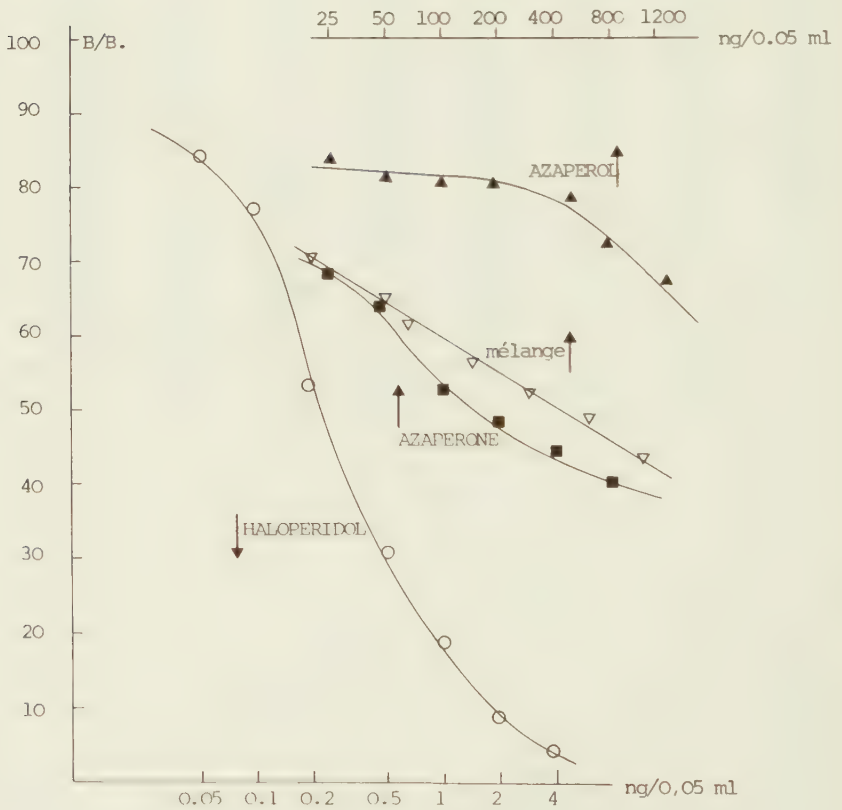


Abbildung 36 - RIA: Verlauf der Veränderungskurven beim zweiten Versuch mit Zugabe von Serum

